

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar belakang

Preeklampsia merupakan suatu sindroma klinis yang didefinisikan sebagai suatu onset baru dari hipertensi dan proteinuria selama waktu paruh kedua kehamilan (Powe *et al*, 2011). Preeklampsia juga bisa diartikan sebagai kondisi spesifik hanya pada kehamilan yang meningkatkan mortalitas dan morbiditas pada maternal dan fetal. Diagnosis preeklampsia ditegakkan pada tekanan darah dengan *cut-off* 140/90 dan harus ada proteinuria (Shamsi *et al*, 2013). Ghulmiyyah dan Sibai (2012) menyebutkan bahwa preeklampsia merupakan sindrom klinis dengan karakteristik onset baru dari hipertensi dan proteinuria setelah 20 minggu usia gestasi pada wanita yang sebelumnya normotensi.

Diagnosis preeklampsia merupakan diagnosis klinis. Sebagaimana didefinisikan oleh *American College of Obstetrics and Gynecology*, diagnosis preeklampsia ditegakkan dengan adanya tekanan darah $> 140/90$ mmHg pada 2 kali pemeriksaan yang dikombinasikan dengan adanya proteinuria > 300 mg per hari (Powe *et al*, 2011).

Prevalensi kejadian preeklampsia sekitar 5%-15% dari keseluruhan kehamilan di dunia, dimana kasus hipertensi dalam kehamilan termasuk preeklampsia ditemukan dalam jumlah yang cenderung meningkat dan merupakan komplikasi medis tersering dalam kehamilan. Sekitar 70% wanita

yang didiagnosis hipertensi dalam kehamilan merupakan kasus preeklampsia (Lei *et al*, 2014). Tiap tahunnya diperkirakan ada 50.000 wanita yang meninggal karena preeklampsia (Shamsi *et al*, 2013). Di Indonesia 30-40% kasus preeklampsia menjadi penyebab kematian ibu hamil dan 30-50% menjadi penyebab kematian perinatal. Di RSUD Dr. Moewardi Surakarta kematian ibu hamil yang disebabkan oleh preeklampsia yaitu 67,6% dari 37 kasus preeklampsia dari 1956 persalinan pada tahun 2008 (Sulistyowati, 2010).

Preeklampsia sendiri menurut Cunningham *et al* (2014) paling baik dideskripsikan sebagai sindroma spesifik kehamilan yang dapat mempengaruhi semua sistem organ. Hal ini membuat preeklampsia merupakan hal yang serius dan komplikasinya sering kurang dipahami sehingga bisaanya akan berkembang menjadi eklampsia atau kematian maternal, hal inilah yang menjadi penyebab penting mortalitas maternal khususnya di Negara berkembang (Shamsi *et al*, 2013). Terdapat banyak komplikasi yang dapat ditimbulkan dari preeklampsia, meliputi eklampsia, *hemolytic elevated liver enzim and low platelet* (HELLP syndrome), *Disseminated Intra Coagulant* (DIC), hipertensi emergensi, hipertensi ensefalopati, dan kebutaan daerah kortikal serebri (Creasy, 2014). Sekitar 3% hingga 5% preeklampsia akan berakhir pada mortalitas maternal (Powe *et al*, 2011).

Etiologi pasti terjadinya preeklampsia belum jelas, namun diduga bahwa disfungsi endotel berperan penting dalam perkembangan terjadinya

preeklampsia (Cunningham, 2013). Baik hipertensi maupun proteinuria, keduanya melibatkan endotel sebagai target organ. Hipertensi pada preeklampsia dikarakteristikkan dengan adanya vasokonstriksi perifer dan penurunan *compliance* dari arteri. Sedangkan terjadinya proteinuria berhubungan dengan lesi patognomonik pada renal yang dikenal sebagai endoteliosis glomerular dimana sel endotel glomerulus mengalami pembengkakan dan kemampuan fenestrasinya menurun (Powe *et al*, 2011).

Beberapa teori yang ada mencoba menjelaskan mengenai terjadinya preeklampsia. Namun diyakini bahwa preeklampsia terjadi dalam dua tahap, Tahap pertama pada stadium preklinik, yaitu pada proses endotelialisasi dimana terjadi gangguan kerja sitotrofoblas serta invasi arteri spiralis pada miometrium yang tidak adekuat. Proses plasentasi yang jelek ini menyebabkan terjadinya iskemia dan hipoksia pada plasenta. Tahap kedua terjadi pada kehamilan lanjut, yaitu adanya stress oksidatif plasenta menyebabkan pelepasan protein antiangiogenik seperti *soluble fms-like tyrosine kinase 1* (sFlt-1), prostaglandin, dan sitokin ke dalam sirkulasi maternal. Keadaan stress oksidatif tersebut akan menekan produksi faktor proangiogenik termasuk *placenta growth factor* (PlGF) dan *vascular endothelial growth factor* (VEGF) (Anant *et al*, 2004).

Akhir-akhir ini diyakini bahwa terdapat sebuah ketidakseimbangan antara faktor anti angiogenik dan juga proangiogenik sebagai alasan terjadinya preeklampsia (Powe *et al*, 2011). Saat ini telah berkembang bukti bahwa ketidakseimbangan antara faktor angiogenik seperti PlGF dan VEGF dengan

faktor pengambat angiogenesis seperti sFlt-1 dan *soluble Endoglin* (sEng), diduga terlibat dalam patogenesis pada preeklampsia. sFlt-1 merupakan antagonis dari PlGF dan VEGF yang terikat pada reseptor yang sama (Creasy, 2014). sFlt-1 menjadi hal yang bertanggung jawab terjadinya sindrom preeklampsia. Pada hewan penelitian yang diinduksi sFlt-1 eksogen memperlihatkan gejala preeklampsia seperti hipertensi, proteinuria, dan kerusakan ginjal. Pada manusia, kadar sFlt-1 juga terbukti meningkat pada pasien preeklampsia, dan kadarnya menurun hingga normal kembali setelah melahirkan. Berbeda dengan dengan sFlt-1, konsentrasi PlGF dan VEGF justru menurun pada preeklampsia. Jadi dapat disimpulkan bahwa preeklampsia terjadi akibat adanya sFlt-1 dan sEng yang disekresikan oleh plasenta yang abnormal. Bersamaan dengan itu terjadi penurunan kerja dari VEGF, PlGF dan juga TGF- β (*Tumor Growth Faktor* - β) sebagai pemelihara endothelium vaskular (Powe *et al*, 2011).

Preeklampsia juga dihubungkan dengan adanya peningkatan stress oksidatif. Jenis oksigen yang reaktif atau dikenal juga dengan *Reactive Oxygen Species (ROS)* memainkan peran penting dalam proses ini. Oksigen reaktif ini berperan dalam pertumbuhan seluler plasenta, diferensiasi, apoptosis dan juga ternyata berperan dalam menentukan *outcome* dari kehamilan itu sendiri. Hipoksia relative pada plasenta terkait dengan sirkulasi uteroplasenta yang inadekuat menimbulkan dihasilkannya PlGF kedalam sistem sirkulasi maternal. Faktor-faktor ini akan menyebabkan gangguan

endotel maternal dan pada akhirnya menyebabkan adanya manifestasi klinis seperti preeklampsia (Ekambaram, 2011).

Untuk mempertahankan keadaan homeostasis yang baik selama stress oksidatif, sel akan mengeluarkan protein stress atau disebut juga *heat shock protein* (HSP) yang berfungsi melindungi sel dari kerusakan (Ekambaram, 2011). Salah satu jenis HSP yaitu HSP70 (HSP dengan berat molekul 70 kDa) bisaanya akan beredar pada sirkulasi perifer wanita sehat yang sedang tidak hamil maupun wanita hamil. Namun peningkatannya sangat signifikan pada wanita hamil dengan preeklampsia yang merefleksikan adanya inflamasi sistemik, stress oksidatif dan juga cedera hepatoseluler. Sehingga peningkatan kadarnya akan lebih signifikan pada wanita hamil dengan *HELLP Syndrome*. Peningkatan kadar protein stress ini juga mengindikasikan adanya kerusakan jaringan dan tingkat keparahan khususnya pada pasien *HELLP Syndrome* (Molvarec *et al*, 2011).

Pemahaman etiopatogenesis preeklampsia dapat menghasilkan strategi untuk mencegah dan memberikan terapi penyakit ini. Pengobatan terhadap preeklampsia sejauh ini hanya terbatas pada pencegahan terhadap terjadinya komplikasi. Beberapa penelitian mencoba memberikan pengobatan preeklampsia pada tahap sebelum timbul gejala klinis (subklinis) yang dilakukan pada hewan coba (mencit). Penelitian hewan coba ini berdasarkan pertimbangan bahwa mencit (*Mus musculus*) paling sering dipakai dalam penelitian biomedik, karena secara genetik mempunyai kemiripan dengan

manusia serta mempunyai kemampuan beradaptasi hidup dalam lingkungan laboratorium (Sulistyowati, 2010).

Adapun VEGF eksogen dapat digunakan dalam penelitian yaitu VEGF 121 rekombinan, yang merupakan protein proangiogenik yang berperan terhadap proses vaskulogenensis dan angiogenesis, mempunyai reseptor didinding endotel yaitu *vascular endotelial growth faktor receptore-1* (VEGFR-1). Dimana VEGFR-1 bisa terikat lebih kuat terhadap sFlt-1. Pengobatan dengan pemberian VEGF 121 rekombinan memiliki kemampuan menghambat sirkulasi sFlt-1 dalam darah, menurunkan tekanan darah maternal, perbaikan fungsi endotel dan mengurangi hipoksia plasenta (Shah, 2007).

Sesuai dengan patogenesis terjadinya preeklampsia tersebut, maka seharusnya terjadi penurunan kadar HSP 70 sebagai ekspresi adanya stress oksidatif pada preeklampsia dengan adanya pemberian VEGF sebagai agen angiogenesis. Berdasarkan latar belakang di atas, maka peneliti ingin mengetahui efek pemberian VEGF 121 rekombinan dalam menurunkan kadar HSP 70 pada mencit dengan model preeklampsia.

1.2 Masalah Penelitian

Apakah ada pengaruh pemberian VEGF 121 rekombinan terhadap ekspresi HSP 70 pada mencit (*Musmusculus*) model preeklampsia?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Menganalisis pengaruh pemberian VEGF 121 rekombinan terhadap ekspresi HSP 70 pada mencit normal, mencit model preeklampsia, dan mencit model preeklampsia.

1.3.2 Tujuan Khusus

Menganalisis pengaruh dan manfaat VEGF 121 rekombinan sebagai terapi preeklampsia dengan melihat ekspresi HSP 70 paska preeklampsia pada mencit model preeklampsia.

1.4 Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan memiliki manfaat dalam :

1. Keilmuan

- a. Hasil penelitian ini diharapkan mampu menambah keilmuan pada program studi kedokteran keluarga terkait ekspresi HSP 70 pada preeklampsia yang kemudian diberikan terapi VEGF 121 rekombinan.
- b. Hasil penelitian ini diharapkan mampu memberikan masukan dan pertimbangan dalam pemeriksaan laboratories biomolekuler setelah mengetahui efek pengobatan VEGF 121 rekombinan pada kasus preeklampsia guna menurunkan angka morbiditas dan mortalitas baik maternal maupun perinatal.

2. Pelayanan

Menjadi bahan pertimbangan dalam pengelolaan kasus preeklampsia di

lapangan dan pemeriksaan klinis terkait kerusakan jaringan akibat preeklampsia.

3. Penelitain

Memberikan sumbangan pengetahuan tentang efek VEGF pada ekspresi HSP 70 pada hewan uji model preeklampsia sehingga dapat menjadi dasar penelitian selanjutnya.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Preeklampsia

2.1.1 Definisi

Preeklampsia merupakan suatu sindroma klinis yang didefinisikan sebagai suatu onset baru dari hipertensi dan proteinuria selama waktu paruh kedua kehamilan (Powe *et al*, 2011). Preeklampsia juga bisa diartikan sebagai kondisi spesifik hanya pada kehamilan yang meningkatkan mortalitas dan morbiditas pada maternal dan fetal. Diagnosis preeklampsia ditegakkan pada tekanan darah dengan *cut-off* 140/90 dan harus ada proteinuria (Shamsi *et al*, 2013). Ghulmiyyah dan Sibai (2012) menyebutkan bahwa preeklampsia merupakan sindrom klinis dengan karakteristik onset baru dari hipertensi dan proteinuria setelah 20 minggu usia gestasi pada wanita yang sebelumnya normotensi.

Sindrom ini berhubungan dengan adanya penurunan perfusi uteroplasenta, peningkatan kematian sel trofoblas dan aktivasi sel endotel maternal dan juga salah satu indikasi mayor dilakukannya operasi cesar elektif. Preeklampsia dikarakteristikan dengan adanya oliguria, xanthin oxidase, asam sialik, aspartat transaminase, kreatinin, asam urat, laktat dehidrogenase, dan edema lokal (Ekambaran, 2011).

Diagnosis preeklampsia merupakan diagnosis klinis. Sebagaimana didefinisikan oleh *American College of Obstetrics and*

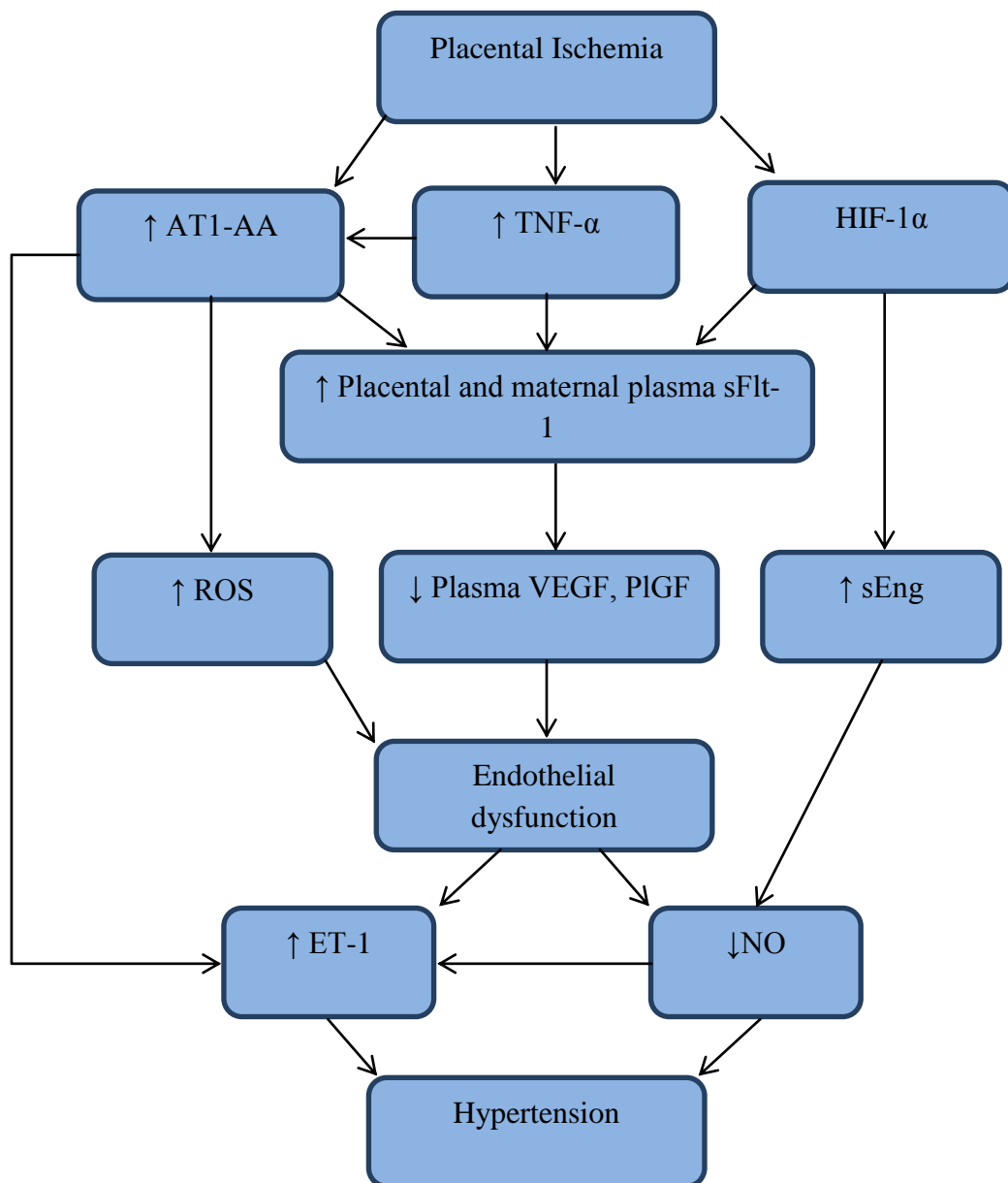
Gynecology, diagnosis preeklampsia ditegakkan dengan adanya tekanan darah $>140/90$ mmHg pada 2 kali pemeriksaan yang dikombinasikan dengan adanya proteinuria >300 mg per hari (Powe *et al*, 2011). Kondisi preeklampsia berat ditentukan jika ditemukan salah satu kriteria sebagai berikut: tekanan darah $\geq 160/110$ mmHg pada dua kali pemeriksaan dalam waktu 6 jam, proteinuria ≥ 5 gram dalam 24 jam atau $+3$ dalam pemeriksaan dipstick dua spesimen urin dalam 4 jam, oliguria (urin < 500 mL dalam 24 jam) (Ekambaran, 2011).

Adapun manifestasi klinis preeklampsia yaitu endoteliosis glomerular, peningkatan permeabilitas vaskuler dan respon inflamasi sistemik yang mengakibatkan kerusakan organ dan hipoperfusi. Hal tersebut akan menyebabkan terjadinya proteinuria, hipertensi, edema serebri, HELLP, dan IUGR (*Intra Uterine Growth Retardation*) (Perkin, 2011). Bisaanya sindrom ini terutama muncul pada akhir trimester kedua sampai ketiga kehamilan. Gejala akan berkurang atau menghilang setelah melahirkan, sehingga terapi definitifnya adalah mengakhiri kehamilan (Cunningham *et al*, 2014).

2.1.2 Patogenesis

Preeklampsia merupakan sindroma sistemik pada kehamilan yang berasal dari plasenta. Diyakini invasi sitotrofoblas plasenta yang inadkuat dan diikuti dengan disfungsi endotel maternal menjadi penyebabnya. Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa adanya faktor

antiangiogenik seperti *soluble fms-like tyrosine kinase 1* (sFlt1) dan juga *soluble endoglin* (sEng) yang muncul di plasenta menjadi penyebab hipertensi, proteinuria dan manifestasi klinis lain (Young *et al*, 2010). Bersamaan dengan itu faktor angiogenik yang menurun juga menjadi penyebab preeklampsia, faktor tersebut antara lain VEGF dan PlGF. Selain faktor-faktor tersebut, faktor genetik, nulipara, riwayat preeklampsia, usia ibu yang terlalu tua atau terlalu muda, obesitas, diabetes, hipertensi kronis, kelainan ginjal serta penyakit autoimun juga berperan dalam kejadian preeklampsia (Hisashi *et al*, 2012)



Gambar 2.1 Bagan patofisiologi preeklampsia (George dan Granger, 2010)

Preeklampsia diawali dengan invasi trofoblas yang dangkal dan kegagalan remodeling arterioli spiral. Hal ini akan menginisiasi keadaan hipoksia dan menghambat ekspresi beberapa agen regulator hipoksia

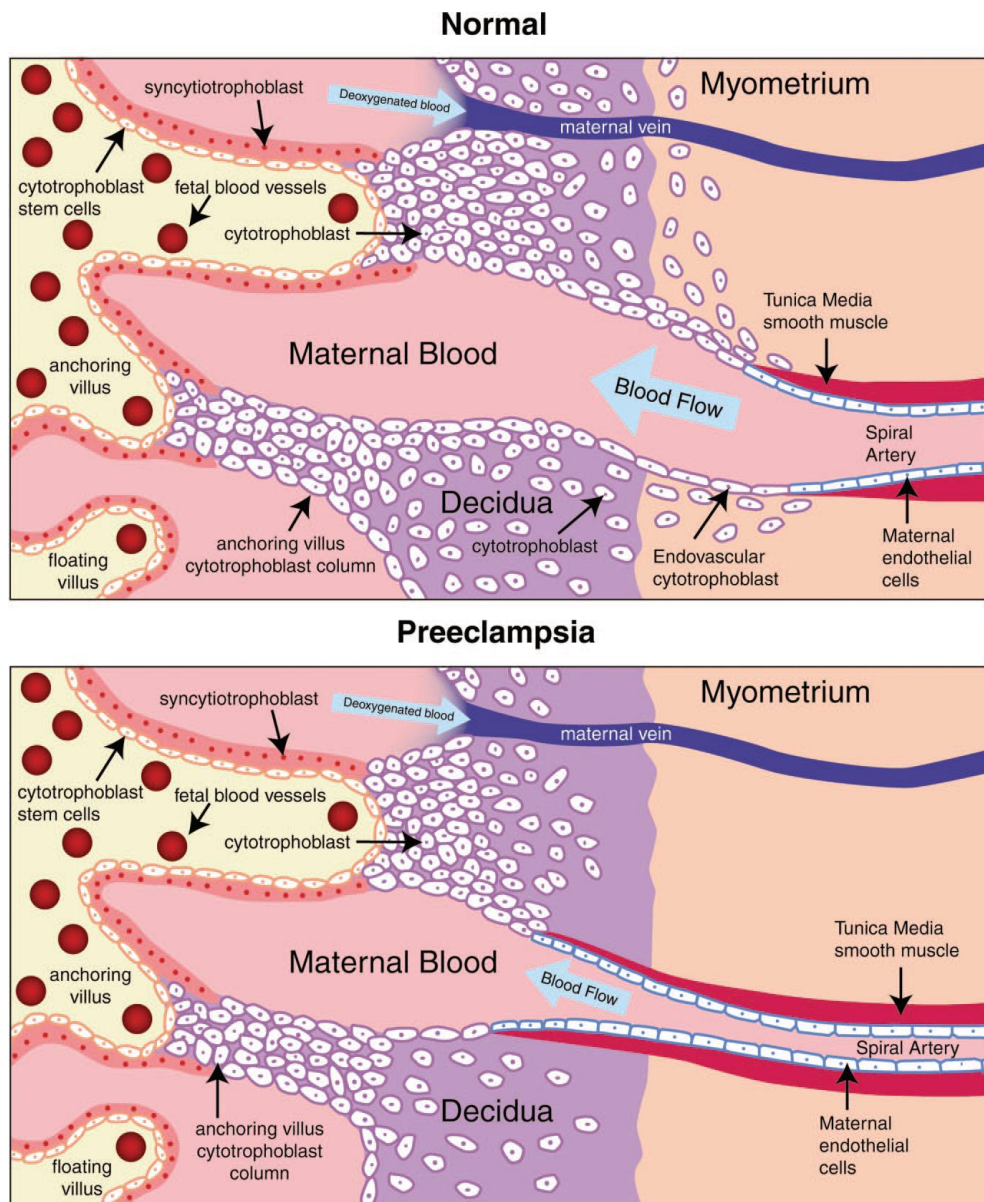
(George dan Granger, 2010). Plasenta hipoksia yang timbul pada awal preeklampsia ini akan berhubungan dengan sFlt-1. Keadaan hipoksia ini pada penelitian menggunakan tikus menunjukkan adanya peningkatan kadar sFlt-1 serum dan menyebabkan adanya sindroma menyerupai preeklampsia (Gilbert *et al* , 2007).

Keadaan ini sebenarnya didahului oleh adanya overekspresi dari gen *hypoxia-like syndrome faktor-1 α* yang akan berhubungan dengan peningkatan fenotip preeklampsia seperti sFlt-1 dan sEng seperti yang disebutkan di atas (Tal *et al*, 2010). Pada kondisi ini juga terjadi penurunan kadar faktor proangiogenik (PlGF, VEGF). Kondisi lingkungan hipoksia di dalam plasenta mengakibatkan vasokonstriksi, peningkatan tekanan darah, dan disfungsi endotel (Powe *et al*, 2011).

Kelainan tersebut mungkin berkaitan dengan jalur nitrit oksida, yang memberikan kontribusi substansial untuk mengontrol tekanan vaskuler. Selain nitrit oksida, adanya stres oksidatif memacu pelepasan dari radikal bebas, lipid oksida, sitokin dan sFlt-1. Hal tersebut mengakibatkan disfungsi endotel dengan gangguan permeabilitas vaskuler dan peningkatan tekanan darah (Ekambaran, 2011).

Proses plasentasi pada mamalia membutuhkan faktor angiogenesis yang tinggi untuk mencukupi kebutuhan oksigen dan nutrisi janin. Faktor proangiogenik dan anti angiogenik bekerja sama dalam perkembangan plasenta. Dipercaya bahwa angiogenesis plasenta pada preeklampsia tidak efektif. Pada preeklampsia, sitotrofoblas gagal

merubah ikatan *cell-surface* dan *adhesion molecules*. Perubahan yang abnormal dari sitotrofoblas merupakan deteksi awal yang akan menyebabkan iskemia plasenta (Hagman, 2012).



Gambar 2.2 Proses Plasentasi Abnormal (Powe *et al*, 2011)

Seperti yang disebutkan sebelumnya, pada gambar di atas dapat dijelaskan bahwa preeklampsia terjadi juga karena penurunan fungsi dari faktor angiogenik seperti VEGF dan analognya yang dihasilkan plasenta yaitu PlGF. Faktor-faktor tersebut sangat penting pada proses embriogenik vaskulogenesis dan angiogenesis. Pada gambar di atas juga terlihat adanya plasentasi normal, sitotrofoblas invasif fetus akan menginvasi arteri spiralis maternal, mengubah vasa darah tersebut vasa darah resisten kaliber kecil menjadi vasa kapabilitas kaliber besar yang mampu menjamin perfusi adekuat bagi pertumbuhan fetus. Selama proses invasi vaskuler, sitotrofoblas berubah dari fenotip epitel menjadi fenotip endotel, sebuah proses yang merujuk pada pseudovaskulogenesis atau mimikri vaskuler. Pada preeklampsia, terjadi kegagalan sitotrofoblas untuk mengadopsi fenotip invasif endotelial. Sebaliknya invasi terhadap arteri spiralis dangkal dan vasa darah tetap menjadi vasa darah yang resisten dengan kaliber kecil (Powe *et al*, 2011).

2.2 Vaskular Endotelial Growth Faktor (VEGF) dan Soluble Fms-like tyrosine kinase-1 (sFlt-1) pada preeklampsia.

Salah satu hal yang paling menjanjikan dalam penelitian beberapa dekade terakhir tentang etiologi preeklampsia adalah peran yang dimainkan oleh faktor pro- dan antiangiogenik (George dan Granger, 2010). Angiogenesis sendiri adalah proses dilatasi pembuluh darah yang melibatkan berbagai faktor, salah satunya adalah faktor angiogenik (Amy

etal, 2007). Umumnya proses angiogenesis dirangsang oleh faktor pertumbuhan seperti VEGF dan PlGF. Adanya kelainan suplai darah ke uterus berhubungan dengan tingginya morbiditas dan mortalitas yang disebabkan oleh persalinan preterm, preeklampsia, atau adanya pertumbuhan janin terhambat (Perkin, 2011).

VEGF yang disekresikan dalam bentuk glikoprotein dimer berperan dalam vaskulogenesis (proses dimana vasa darah baru terbentuk pada proses embrionik) dan angiogenesis (proses pembentukan pembuluh darah baru yang merupakan cabang dari sebuah pembuluh darah). Pada mamalia seperti manusia, family dari *growth factors* ini termasuk VEGF-A (lebih dikenal dengan VEGF) dan juga PlGF. (Powe *et al*, 2011). VEGF menginduksi terjadinya angiogenesis dan proliferasi sel endotel serta berperan penting dalam proses vaskulogenesis (Nicolaidis, 2014). Selain itu VEGF juga berperan dalam proliferasi dan pemeliharaan sel endotel dan juga menginduksi permeabilitas vaskular. (Powe *et al*, 2011).

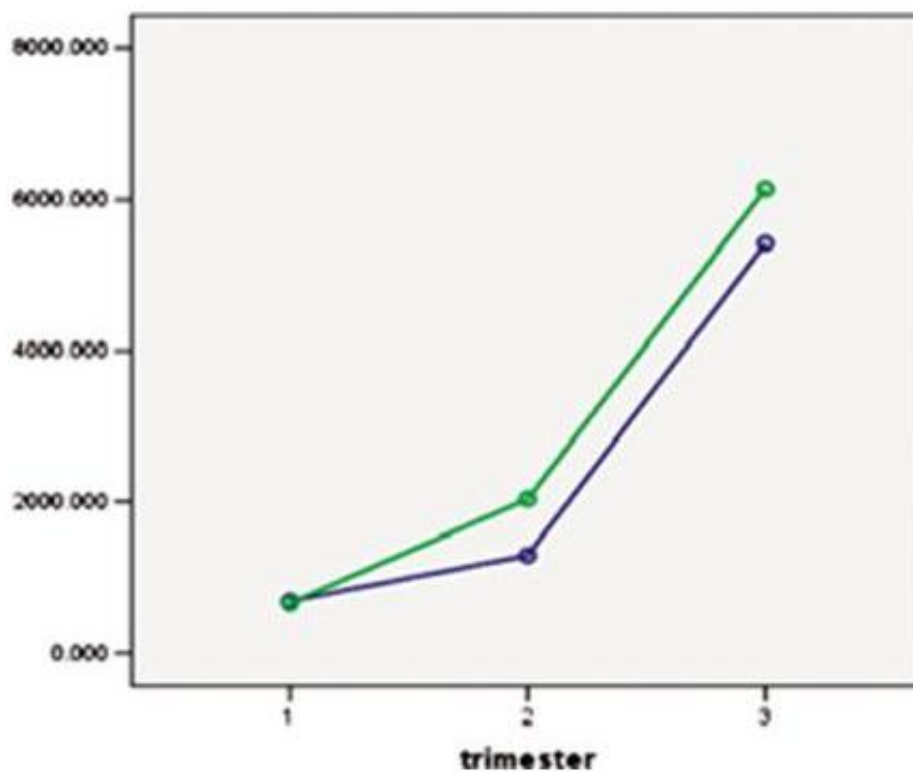
Inhibisi pada VEGF in vivo menunjukkan keadaan patologi pada banyak organ terkait dengan endotel terfenestrasi, yang akan berdampak seperti timbulnya preeklampsia. VEGF merupakan sitokin yang multi faktor yang berperan dalam angiogenesis secara in vivo. VEGF dapat ditemukan pada sel yang berbeda, contohnya seperti otot polos, sel endotel, monosit/makrofag, dan *polymorphonuclear neutrophils* (PMNs). Faktor tersebut sangat penting dalam stimulasi vaskulogenesis uteroplasenta. Proses angiogenesis sebenarnya merupakan proses

kompleks, selain ditentukan oleh faktor proangiogenik juga oleh status nutrisi (Omidet al, 2007). Nutrisi yang terkait dengan proses tersebut, yaitu mikro nutrient vitamin A dan antioksidan (Sharon *et al*, 2009).

VEGF memiliki beberapa reseptor yaitu VEGFR-1 atau dikenal juga dengan Flt-1, VEGFR-2, Tie-1, dan Tie-2. Reseptor-reseptor ini juga memiliki peran penting dalam perkembangan vaskular plasenta. Perubahan regulasi dan *signaling* pada jalur angiogenik awal gestasi juga membantu terjadinya invasi sitotrofoblas yang tidak adekuat seperti yang terlihat pada preeklampsia. Pada manusia, ligand dan reseptor VEGF diekspresikan dalam kadar tinggi oleh jaringan plasenta pada trimester pertama. Pada preeklampsia, terjadi perubahan pada invasi sitotrofoblas terkait VEGF, PlGF, dan Flt-1 (Young *et al*, 2010).

Seperti yang sudah banyak dijelaskan sebelumnya, salah satu faktor yang banyak dibahas dalam kejadian preeklampsia adalah sFlt-1. sFlt-1 adalah sebuah variant sambungan dari VEGFR-1 yang panjang dimana sitoplasma dan domain trans membrannya diperpanjang dan telah terbukti diproduksi oleh trofoblas plasenta. Kadar sFlt-1 muncul dalam sirkulasi sejak 3 bulan sebelum onset preeklampsia. Kadar sFlt-1 plasenta maupun plasma pada preeklampsia lebih tinggi daripada kehamilan normal dan keadaan ini dapat dijadikan alat prediksi sebelum gejala preeklampsia muncul.

Kadar sFlt-1 baik pada kehamilan normal maupun kehamilan dengan preeklampsia. Selama kehamilan normal terjadi kondisi proangiogenik, yaitu tingkat sFlt-1 rendah sampai akhir trisemester II dan kadar PlGF tinggi (Young *et al*, 2010). Kadar PlGF yang rendah pada sebelum atau awal kehamilan bisa menjadi faktor resiko terjadinya preeklampsia (George dan Granger, 2010). Kadar sFlt-1 ini kemudian akan meningkat seiring dengan kadar PlGF yang menurun. (Francisco *et al*,

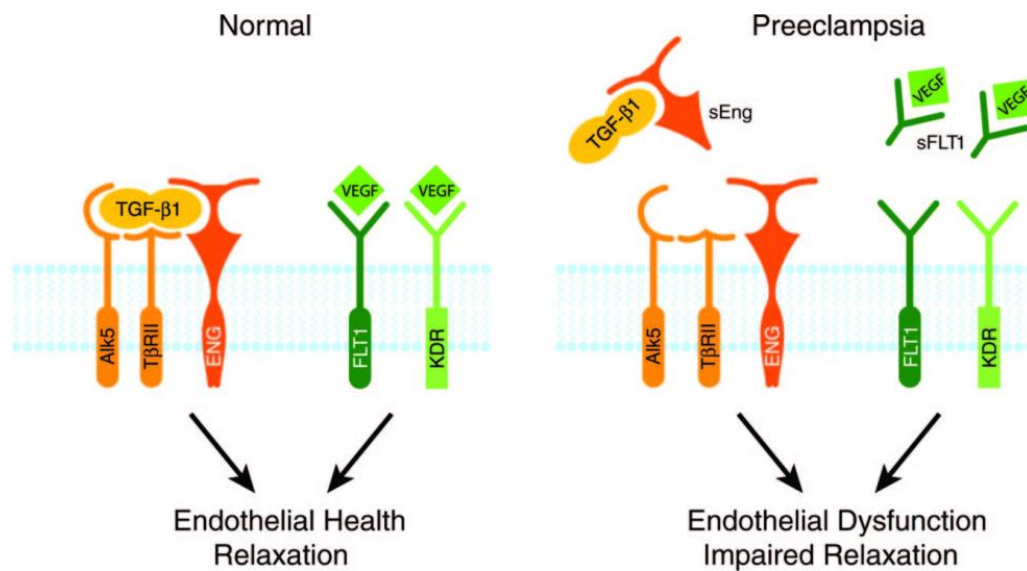


2011)

Gambar 2.3 Progresifitas kenaikan kadar sFlt-1 menurut waktu (Hutabarat, 2011)

Studi yang dilakukan oleh Chappell *et al* (2009) menunjukkan tentang peran gen Flt-1 yang mungkin mengekspresikan sFlt-1 (Solubel

penghambat sinyal VEGF) yang berperan terutama dalam meregulasi pertumbuhan vasa darah baru yang dimodulasi oleh VEGF lokal. Pada gambar di bawah ini tampak sFlt-1 yang menyebabkan disfungsi endotel dengan menghambat sinyal VEGF dan TGF- β . VEGF dan TGF- β dibutuhkan untuk memelihara kesehatan endotel pada beberapa jaringan seperti ginjal dan mungkin juga plasenta. Pada kehamilan normal, homeostasis vaskular dipertahankan oleh sinyal level fisiologis VEGF dan TGF- β pada pembuluh darah. Sedangkan pada kehamilan dengan preeklampsia, kelebihan sekresi sFlt-1 dan sEng (2 protein antiangiogenik endogensirkulasi) menghambat penghantaran sinyal VEGF dan TGF- β secara berurutan di pembuluh darah. Hal tersebut menyebabkan disfungsi sel endotel, termasuk penurunan prostasiklin, produksi nitrit oksida, vasokonstriksi dan pengeluaran protein prokoagulan (Powe *et al*, 2011).



Gambar 2.4 Penghambatan VEGF dan TGF- β oleh sFLT-1 dan sEng (Powe *et al* 2011)

2.3 Stres Oksidatif Pada Preeklampsia dan *Heat Shock Protein*

Patogenesis preeklampsia berhubungan dengan meningkatnya ketidakseimbangan stres oksidatif, dikombinasi dengan kurangnya perlindungan anti-oksidan. Dalam kondisi normal, antioksidan yang memadai, dismutase superoksida khususnya, cata-Lase, glutation peroksidase dan reduktase, menangkap sebagian besar radikal bebas dan berfungsi sebagai mekanisme pertahanan baris pertama dalam respon terhadap stres oksidatif. Keseimbangan ini hilang selama preeklampsia karena peningkatan besar dalam stres oksidatif. Ketidakseimbangan oksidatif ini menyebabkan akumulasi protein yang rusak mengganggu homeostasis protein, pada akhirnya mengakibatkan kematian sel melalui apoptosis. Tingkat stres oksidatif, dan antioksidan dalam sel endotel

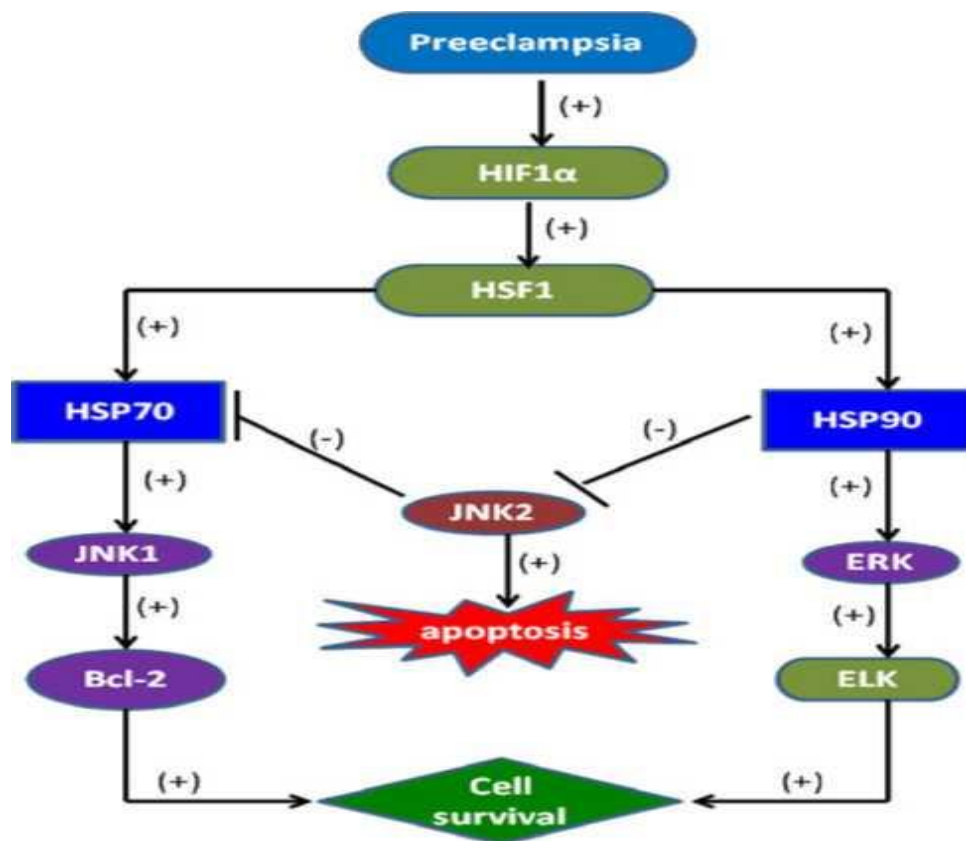
preeklampsia dijelaskan sebelumnya (Padmini *et al*, 2009). Pemantauan perubahan sinyal pada sel endotel plasenta akan membantu mengidentifikasi mekanisme yang mendasari kelahiran janin hidup, walaupun terdapat komplikasi yang ada (Padmini dan Uthra, 2012).

Reactive Oxygen Species (ROS) memainkan peran penting dalam pertumbuhan seluler plasenta, diferensiasi, apoptosis dan penentuan hasil dari konsepsi. ROS ini akan muncul sebagai hasil dari keadaan hipoksia plasenta karena adanya proses plasentasi yang tidak adekuat (Padmini, 2011). ROS ini akan menginduksi terjadinya stress oksidatif terkait dengan adanya kerusakan dari sel endotel yang akan berujung pada preeklampsia (Padmini dan Lavanya, 2011).

ROS ini adalah salah satu dari banyak stress yang bisa menginduksi produksi HSP. HSP sangat terindungi, dapat ditemukan pada semua sel dan diekspresikan ketika ada stress lingkungan, stimulasi fisiologis maupun patologis. HSP70 adalah protein terinduksi stress yang memainkan peran penting pada mekanisme pertahanan terhadap agen yang memacu cedera oksidatif, mencegah agregasi protein yang terinduksi stress dan memperbaiki keadaan ikatan protein normal (Padmini dan Lavanya, 2011). HSP70 adalah *family multigen* yang memiliki berat molekul antara 10 sampai 150 kDa dan ditemukan pada semua kompartemen sel (Padmini, 2011). Terdapat bukti bahwa HSP diproduksi oleh jaringan plasenta dan memiliki peran fisiologis dalam manajemen stress selama preeklampsia.

HSP70 dilaporkan meningkat sebagai respon terhadap peningkatan stress oksidatif terhadap mitokondria dan stress nitratif selama ada preeklampsia (Padmini, 2011). Pada studi yang dilakukan oleh Molvarec *et al* pada tahun 2011 didapatkan bahwa kadar HSP70 pada wanita dengan preeklampsia memiliki kadar 0,58 pg/mL dibandingkan dengan kadar HSP70 pada wanita normal yakni sebesar 0,28 pg/mL.

HSP70 dapat menekan produksi ROS mitokondrial dengan melakukan stabilisasi sitokrom c dan komponen penting lain dari rantai transport electron dan dengan meningkatkan mekanisme kerja antioksidan terhadap mitokondria. Interaksi HSP70 dengan protein apoptosis dapat mencegah terjadinya apoptosis dengan cara mencegah terbentuknya apoptosome (Padmini, 2011).



Gambar 2.5 Skema representasi dari mekanisme transduksi sinyal dalam pre-eklampsia sel endotel (Padmini dan Uthra, 2012)

Pada gambar di atas terlihat proses pertahanan HSP70 terhadap kerusakan sel. Terlihat bahwa stres dibangun oleh preeklampsia sebagai faktor stimulasi transkripsi *hypoxia-inducible faktor* (HIF) dalam sel endotel yang penting untuk sintesis protein sitoprotektif HSP70 dan 90 melalui aktivasi *heat shock factors-1* (HSF1). HSP70 dan 90 membangun mekanisme sitoprotektif dengan mengubah ekspresi *Jun amino-terminal kinases-1* (JNK1), *Jun amino-terminal kinases-2* (JNK2), dan *extracellular-signal-regulated kinase* (ERK). JNK1 diaktifkan Bcl-2 dan

mempromosikan kelangsungan hidup sel dengan menjaga integritas membran mitokondria. ERK mengaktifkan ekspresi faktor transkripsi nuklear lainnya Elk yang mempromosikan kelangsungan hidup sel. JNK2 di sisi lain protein pro-apoptosis ekspresi yang relatif diatur – turun dalam kondisi ini (Padmini dan Uthra, 2012)

2.4 Terapi VEGF 121 Rekombinan

Seperti yang telah dijelaskan pada bagian sebelumnya, patofisiologi dari preeklampsia tidak terlepas dari peran VEGF dan PlGF sebagai faktor angiogenik serta sFlt-1 dan sEng sebagai faktor antiangiogenik. Pada preeklampsia kadar VEGF akan turun atau tetap dengan kadar sFlt-1 yang meningkat. Sehingga terapi dari VEGF 121 rekombinan adalah untuk meningkatkan kadar VEGF tersebut. VEGF 121 rekombinan adalah VEGF eksternal yang merupakan protein bersifat proangiogenik yang berperan terhadap proses vaskulogenesis dan angiogenesis, mempunyai reseptor di dinding endotel yaitu VEGFR-1 dan bisa terikat juga dengan ikatan yang lebih kuat pada sFlt-1. VEGF 121 rekombinan salah satu bentuk VEGF yang merupakan *diffusible acid polypeptide* mempunyai aktivitas seperti VEGF. VEGF 121 rekombinan berikatan dengan VEGFR-1 sehingga memicu proses angiogenesis (Maynard *et al*, 2011).

Pada penelitian lain juga disebutkan bahwa VEGF 121 rekombinan pada mencit hamil bisa menurunkan *angiotensin type 1* yang

memicu timbulnya hipertensi dan proteinuria. Oleh karena itu diduga terapi VEGF sangat berpengaruh pada fungsi ginjal terutama pada fungsi sel endotel glomerulus (Siddiqui A *et al*, 2011).

Dosis 400 µg/kg dua kali sehari yang diberikan pada mencit model preeklampsia terbukti dapat menurunkan tekanan darah sistolik, menurunkan proteinuria dan juga mencegah terjadinya endotheliosis (Li *et al*, 2007). VEGF menekan hipertensi dengan cara merangsang sel endotel untuk mengeluarkan nitric oksida dan prostasiklin. Berdasarkan fungsi dari VEGF yang bisa memicu faktor angiogenesis dan antihipertensi maka terapi VEGF 121 rekombinan juga bisa berfungsi sama dengan VEGF endogen. Pemberian terapi VEGF 121 rekombinan juga bisa menetralisasi efek dari peningkatan sFlt-1 pada preeklampsia sehingga pengikatan sFlt-1 ke faktor pro angiogenik bisa menurun dan fungsi angiogenesis kembali normal (Maynard *et al*, 2011).

2.5 Preeklampsia pada Mencit *Mus musculus*

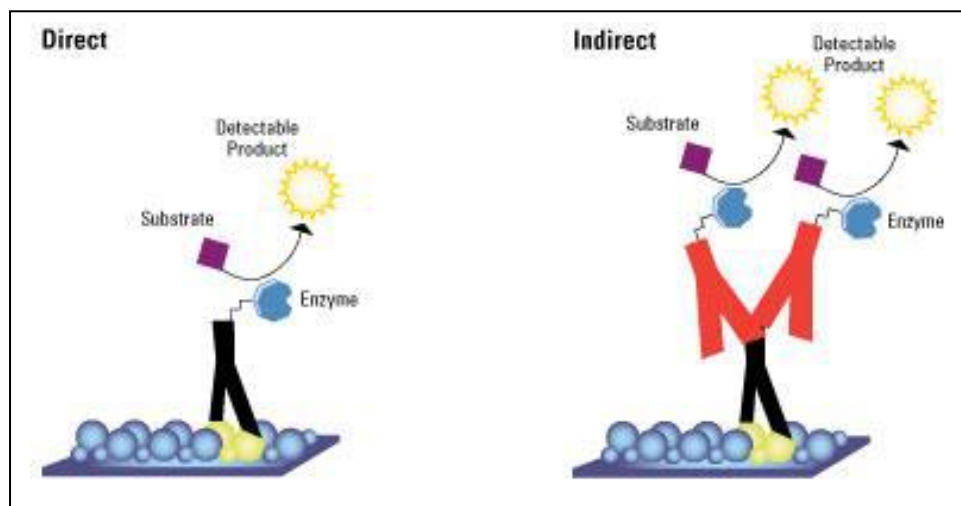
Human leucocyte antigen-G HLA-G merupakan molekul *major histocompatibility complex* (MHC) kelas 1b non klasik, bersifat monomorfik dan memiliki kemampuan menghambat aktivitas sel *Natural Killer* (NK) dan *Large granular lymphocytic* (LGL) desidua yang berfungsi melawan sel trofoblas sehingga HLA-G mempunyai fungsi melindungi trofoblas dari pengaruh imun maternal. Selama kehamilan trofoblas mempertahankan peningkatan regulasi ekspresi HLA-G sehingga

kerja trofoblas dalam menginvasi residua system vaskuler maternal berjalan baik. Jika HLA-G tidak diekspresikan atau menurun, kemampuan trofoblas akan berkurang dalam menginvasi uterus (dianggap nonself). Jika trofoblas tidak menginvasi arteri maternal dengan baik maka aliran uteroplasenter menurun dan terjadi hipoksia plasenta yang menyebabkan preeklampsia (Soloski *et al*, 2008).

Gen kelas 1 lokus MHC baik pada manusia maupun pada tikus mengkode sejumlah besar gen (sekitar 50) yang member kode protein dengan struktur mirip kelas I, disebut gen kelas Ib. Gen tersebut meliputi E, F, G, H, J, dan X pada manusia dan Qa, Tia pada tikus. Fungsi sejumlah besar gen ini belum diketahui, tetapi beberapa dapat berperan dalam mengendalikan imunitas bawaan, kemungkinan dengan mengatur aktivasi sel NK. Pada mencit, Qa-2 produk gen *preeimplantasi embryonic development* (Ped) merupakan protein MHC Class Ib yang merupakan homolog dari HLA-G pada manusia. Embrio mencit yang mengekspresikan Qa-2 menghasilkan kecepatan pembelahan yang lebih nyata, survival sampai aterm dan menghasilkan berat badan lahir yang baik dan sebaliknya apabila mencit tidak mengekspresikan Qa-2 maka akan terjadi keguguran, kematian janin mencit, persalinan premature dan berat lahir janin mencit yang rendah (Playfaire *et al*, 2009; Roth, 2013).

2.6 Imunohistokimia

Imunohistokimia merupakan teknik pengecatan dengan prinsip mengambil keuntungan dari afinitas antigen-antibodi melalui kemampuan untuk mengidentifikasi dan melokalisasi protein yang menarik melalui deteksi menggunakan konjugat berlabel. Dalam contoh sederhana, sebuah antibodi primer (pertama di urutan penggunaan, diarahkan untuk epitop antigen) yang telah memiliki 'label' tertentu, diperbolehkan untuk melakukan pengikatan. Antibodi dan antigen pada permukaan jaringan akan dideteksi melalui serangkaian proses, yang akan memvisualisasikan label untuk dilakukan analisis dan kuantifikasi. Proses ini disebut IHC langsung. Sedangkan yang disebut IHC tidak langsung adalah yang menggunakan perantara antara antibodi primer dengan sistem pendeteksi (Boudreau, 2011).

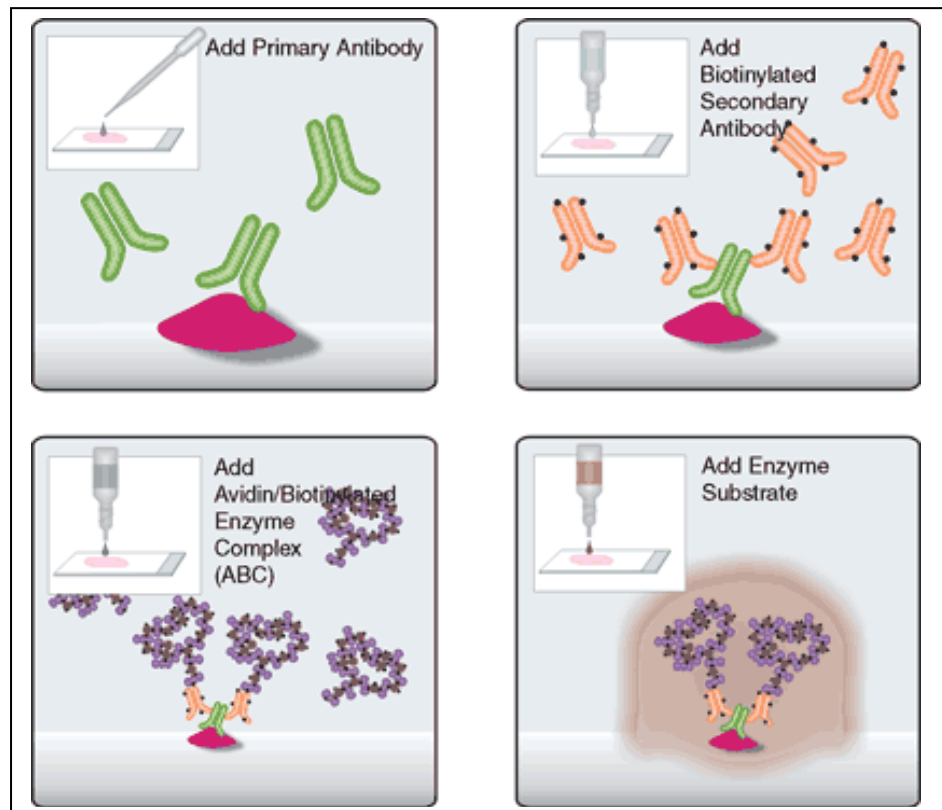


Gambar 2.6 IHC langsung dan tidak langsung

Berbagai enzimatis dan fluoresensi digunakan sebagai label pada IHC. Enzim seperti horseradish peroksidase menggunakan chromogens yang menghasilkan endapan yang dapat terlihat dengan mikroskop cahaya normal. Hal ini disebut gambaran "brightfield". Gambaran ini lebih stabil, permanen, dan memungkinkan dilakukan counterstaining sehingga jaringan di sekitarnya dapat dilihat untuk memberikan konteks ke lokasi antigenik. Label fluorescent menghasilkan warna cerah pada panjang gelombang tertentu, yang memungkinkan kompleks antigen-antibodi dapat dilihat dalam lapang gelap pada mikroskop fluoresensi (Bouderau, 2011).

Sebelum masuk pada tahap deteksi, hal yang harus dilakukan adalah label enzimatis menggunakan horseradish peroksidase (HRP). Langkah selanjutnya dalam proses ini akan melibatkan label terkonjugasi sekunder untuk antibodi primer. Kemudian menempatkan chromogen di tempat dimana gambaran brightfield akan dimunculkan. Salah satu metode yang paling umum adalah dengan menggunakan enzim HRP (label) untuk mengkatalisis substrat DAB, menciptakan endapan produk reaksi di lokasi yang terlihat dengan mikroskop. Sinyal dari interaksi ini dapat ditambah dengan memasukkan bahan-bahan yang memiliki afinitas biotin-avidin kuat, atau afinitas biotin-streptavidin. Dalam prosedur ini, antibodi sekunder tidak diberi label dengan HRP, tetapi dengan biotin. Antibodi sekunder sekarang menjadi antibodi terbiotinilasi. Molekul terbiotinilasi ini mengikat antibodi primer, dan kemudian terikat pada molekul HRP

berlabel streptavidin. Teknik ini menempatkan lebih banyak molekul HRP ke konjugat, meningkatkan sensitivitas uji. Setelah molekul HRP terikat, mereka dapat mengkatalisis DAB substrat-chromogen menjadi endapan yang terlihat.



Gambar 2.7 Proses deteksi pada pewarnaan IHC

Ada banyak teknik yang tersedia, tergantung pada kompleksitas dan derajat sensitivitas yang diperlukan. Ada beberapa tipe spesimen yang dapat digunakan untuk pewarnaan immunohistokimia, yang paling sering digunakan ialah *paraffin-embedded tissue sections*. Blok jaringan diperoleh dari spesimen makroskopis namun tidak merubah morfologisnya, dan diproses dengan menggunakan lilin paraffin pada

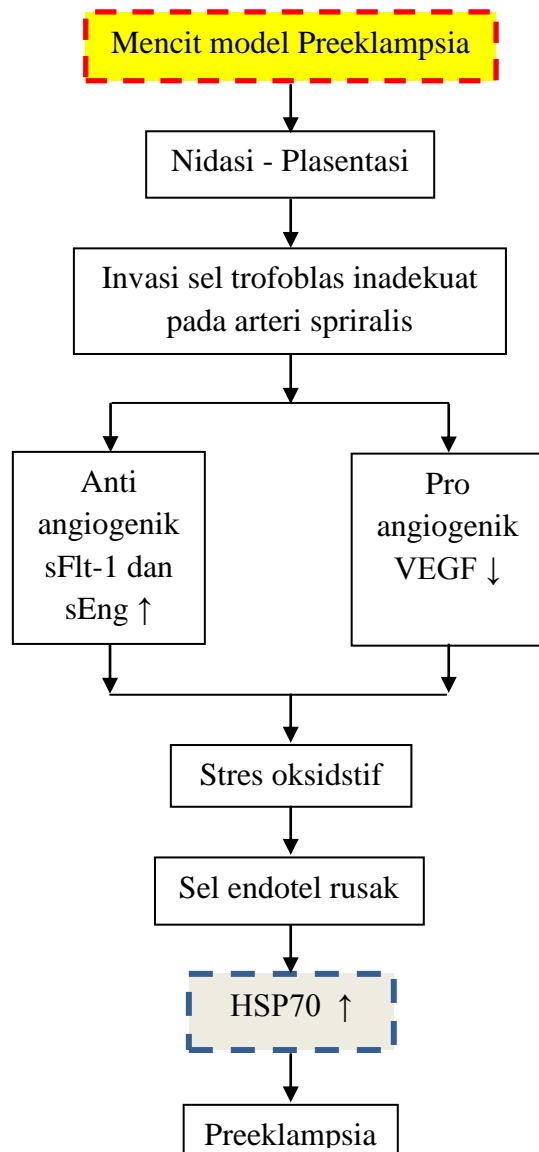
jaringan selama dilakukan mikrotomi. Jaringan dipotong dengan ketebalan sekitar 4 μm dan dibiarkan terapung dalam rendaman air sebelum diletakkan diatas *glass slide*. Potongan tersebut kemudian dikeringkan sekitar 60° C untuk meningkatkan perlekatan jaringan dan membantu sisa-sisa besi keluar selama dilakukan proses mikrotomi. Sebelum pewarnaan Immunohistokimia, dilakukan proses *de-waxing* terlebih dahulu (Renshaw, 2006)

2.7 Penelitian yang Relevan

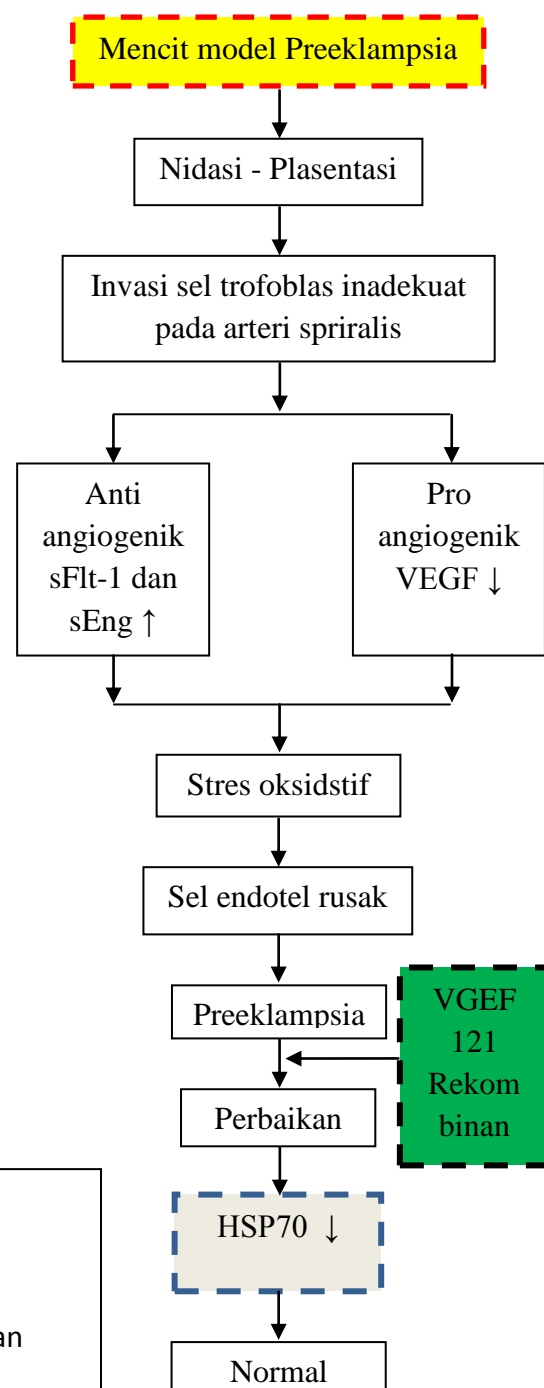
Penelitian yang dilakukan oleh Molvarec *et al*, 2011 menyebutkan bahwa terjadi peningkatan kadar HSP70 serum pada preeklampsia dimana preeklampsia di tegakkan dengan klinis. Adapun gambaran klinis meliputi: proteinuria, hematuria, ureum, kreatinin, BUN, serta asam urat. Batas kadar HSP70 yang digunakan untuk menegakkan preeklampsia adalah >0,34 pg/mL.

2.7. Kerangka Teori

Mencit Model Preeklampsia



Mencit Model Preeklampsia dengan Perlakuan VEGF 121 Rekombinan



Keterangan :

- : Mengakibatkan
- : Bahan dasar penelitian
- : Komponen yang diperiksa
- : Perlakuan

Penjelasan Kerangka Teori

- a. Perkembangan plasenta yang abnormal (infark, sklerosis) mengakibatkan insufisiensi plasenta dan pelepasan beberapa material plasenta ke dalam sirkulasi maternal sehingga terjadi invasi endovaskuler oleh sitotrofoblas. Invasi tersebut di ikuti kegagalan remodeling dari arteri spiralis dan desidua basalis.
- b. Hal tersebut mengakibatkan rendahnya oksigenasi yang mengalir melalui plasenta. Pada kondisi ini terjadi penurunan kadarfaktor proangiogenik (VEGF) dan peningkatan faktor anti-angiogenik (sFlt-1), appoptosis, radikal bebas, lipid oksida, dan sitokin. Yang mengakibatkan vasokonstriksi, peningkatan tekanan darah, dan disfungsi endotel.
- c. Proses angiogenesis plasenta pada preeklampsia tidak efektif. Disebabkan karena sFlt-1 mempunyai afinitas yang lebih kuat terhadap VEGF sehingga menyebabkan jumlah VEGF bebas menurun di sirkulasi maternal dan mencegah berikatan dengan reseptornya.
- d. Selama kehamilan normal, terjadi kondisi proangiogenik, yaitu tingkat sFlt-1 menurun.
- e. Sebaliknya pada saat kehamilan preeklampsia, tingkat sFlt-1 secara bertahap akan meningkat sehingga keseimbangan akan bergeser menjadi melemahkan faktor proangiogenik, yang menyebabkan konsentrasi VEGF menjadi rendah. Proses stress oksidasi pun muncul menyebabkan adanya kerusakan sel endotel plasenta yang berujung pada preeklampsia. Selain itu

stress oksidatif ini akan menyebabkan ekspresi HSP70 sebagai responnya mengalami peningkatan sehingga kadarnya akan melebihi batas 0,34 pg/mL.

- f. VEGF rekombinan yang terikat dengan sFlt-1 dapat menginduksi kemotaksis monosit dan memodulasi migrasi PMN trans-endotelial dan aktivasinya. Sehingga VEGF rekombinan dapat berfungsi untuk menginduksi terjadinya angiogenesis dan proliferasi sel endotel serta berperan penting dalam proses vaskulogenesis.
- g. Pemberian VEGF rekombinan diharapkan dapat menurunkan kadar protein stress dan akan menurunkan ekspresi HSP70 dimana tidak terjadi perubahan warna sel trofoblas pada pengecatan imunohistokimia..

2.8. Hipotesis

Ada pengaruh pemberian VEGF 121 rekombinan terhadap ekspresi HSP 70 pada mencit (*Mus musculus*) model preeklampsia.

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental analitik (eksplanatorik) dengan rancang bangun *Randomized Control Trial* (RCT).

Penelitian ini dilakukan pada hewan coba mencit betina *Mus musculus* bunting pada usia kebuntingan enam belas hari, untuk mengetahui perbedaan kadar HSP70 pada trofoblas mencit bunting normal, mencit bunting model preeklampsia tanpa terapi VEGF 121 rekombinan, dan mencit bunting model preeklampsia dan mendapat terapi VEGF 121 rekombinan.

3.2 Waktu Penelitian

Penelitian ini direncanakan bulan Februari hingga Maret 2016.

3.3 Tempat Penelitian

3.3.1 Penelitian ini dilaksanakan di kandang Hewan Percobaan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga untuk proses membuntingkan mencit dan membuat mencit bunting model preeklampsia serta memelihara mencit bunting sampai dengan pengambilan sampel.

3.3.2 Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Hewan Universitas

Airlangga untuk penilaian kadar HSP70 serum sampel penelitian.

3.4 Populasi, Besar Sampel, dan Teknik Pengambilan Sampel

3.4.1 Penelitian pada hewan coba menggunakan trofoblas mencit yang memenuhi criteria inklusiya itu berasal dari mencit betina *Mus musculus* galur Swiss diperoleh dari pusat Veterinaria Farma Surabaya. Dalam penelitian ini diperoleh mencit betina umur 3 bulan, sehat, dengan berat badan 20-25gram.

3.4.2 Penelitian hewan coba ini berdasarkan pertimbangan bahwa mencit *Mus musculus* paling sering dipakai dalam penelitian biomedik, karena secara genetic mempunyai kemiripan dengan manusia serta mempunyai kemampuan beradaptasi hidup dalam lingkungan laboratorium. Pengambilan sampel preparat dilakukan pada serum mencit yang selanjutnya disentrifugasi dalam suhu ruang dengan gaya 3000 gram per 10 menit kemudian disimpan dalam suhu -80 °C sebelum dilakukan pengukuran.

3.4.3 Jumlah/besar sampel untuk pengujian hipotesis penelitian ditentukan berdasarkan rumus replikasi dari Steel dan Torrie.

$$(t - 1)(r - 1) \geq 15$$

$$(3 - 1)(r - 1) \geq 15$$

$$r \geq \frac{15 + 2}{2}$$

$$r > 8,5 \text{ (n = 9)}$$

Keterangan :

t : jumlah perlakuan

r : jumlah sampel yang diperlukan

Berdasarkan rumus diatas maka tiap kelompok perlakuan adalah 8,5 (n=9) dan untuk menghindari penurunan jumlah sampel akibat kematian, sakit, mencit yang mengalami partus prematurus maupun penurunan berat badan selama penelitian sebesar 10% maka jumlah sampel tiap kelompok diperbanyak menjadi 10, sehingga jumlah seluruh sampel penelitian menjadi 30 mencit.

Metode atau cara pengambilan sampel adalah dengan membuntingkan 3 kelompok mencit, dari ketiga kelompok mencit bunting tersebut, kelompok pertama tanpa diberiperlakuan lagi, kelompok kedua mendapat perlakuan lagi menjadi mencit model preeklampsia, kelompok ketiga mendapat perlakuan menjadi model preeklampsia dan mendapat VEGF 121 rekombinan.

Pada hari ke-16 masa bunting mencit, dari ketiga kelompok dilakukan pengambilan sampel trofoblas mencit. Alasan pengambilan pada hari ke-16 adalah dianalogikan seperti kehamilan trimester kedua pada kehamilan manusia, dimana pada trimester kedua manifestasi preeklampsia muncul pada manusia.

3.5 Variabel Penelitian

1. Variabel bebas : pemberian VEGF 121 rekombinan
2. Variabel tergantung : ekspresi HSP70 pada trofoblas

3.6 Definisi Operasional

3.6.1 Pemberian VEGF 121 Rekombinan

VEGF 121 rekombinan adalah protein yang bersifat proangiogenik yang berperan terhadap proses vaskulogenesis dan angiogenesis, mempunyai reseptor di dinding endothel yaitu VEGFR-1 dan bisa terikat juga dengan ikatan yang lebih kuat pada sFlt-1. Bahan ini didapat dari kit recombinant VEGF 121 (*recombinant mouse*) dengan dosis 125 mg/kgBB satu kali. Skala ukuran variable ini adalah kategorikal nominal.

3.6.2 Ekspresi HSP70

HSP70 adalah protein *heat shock* yang berasal dari jaringan trofoblas mencit model preeklampsia yang mempunyai berat molekul 70 kD. Adanya ekspresi HSP70 dilihat dengan bantuan teknik imunohistokimia menggunakan mikroskop. Ekspresi HSP70 pada preeklampsia ditentukan dengan adanya perubahan sel trofoblas mencit menjadi berwarna coklat chromogen pada pengecatan IHC. Skala ukuran variable ini adalah kategorikal nominal.

3.7 Kriteria Subjek Penelitian

- 3.7.1 Kriteria Inklusi : sediaan sampel trofoblas mencit yang berasal dari

mencit bunting betina *Musmusculus* galur Swiss, umur 3 bulan, sehat, dengan berat badan 20-25gram, yang belum pernah dipakai penelitian.

3.7.2 Kriteria Eksklusi : sediaan sampel trofoblas yang rusak dan tidak dapat diproses lebih lanjut serta berasal dari mencit yang meninggal selama penelitian.

3.8 Instrumen Penelitian

3.8.1 Kandang

Kandang mencit merupakan tempat mencit, berupa bak plastik yang diberi penutup kawat. Masing-masing kandang berisi 15 ekor mencit. Kandang berukuran 40 x 30 x 15 cm.

3.8.2 Makanan

Makanan berupa pakan mencit pelet yang diberikan pagi dan sore sebanyak 100 g/kg BB dan minuman mencit akan mendapatkan jenis dan porsi yang sama.

3.8.3 Alat dan Bahan Penelitian

a. Alat pengambilan serum mencit adalah

- Sduit 5 cc
- Tabung plain 5 cc
- Lemari pendingin
- *Cold storage*
- *Ice pack*

- *Sentrifuge*
- b. Bahan kit
 - Kit anti Qa2 antibody (5K44)
 - Kit recombinant VEGF 121 (Recombinant mouse) Xeno-freeTM
 - Pregnant More Serum Gonadotropin (PMSG) PG 600
 - Human Chorionic Gonadotropin (hCG) Chorulon 1500 iu
 - Kit HSP70

3.9 Tahapan Penelitian

Tahapan awal penelitian adalah melakukan sinkronisasi birahi yaitu mencit betina dewasa usia 3 bulan dengan berat badan 20-25 gram disuntik 5 IU hormone *Pregnant More Serum Gonadotropin* (PMSG), 48 jam kemudian disuntik 5 IU Human Chorionic Gonadotropin (hCG). Mencit betina tersebut dikawinkan secara monomating, yaitu satu persatu mencit betina yang sudah disinkronisasi birahi dimasukkan kedalam kandang yang berisi satu mencit jantan umur 7 bulan berat ± 60 gram. Diagnosis bunting didapatkan 17 jam setelah dikawinkan dan dievaluasi adanya copulatory plug (sumbat yang menutupi vagina mencit dari serviks sampai vulva).

Langkah selanjutnya adalah pada hari ke-1 kehamilan, dari seluruh sampel yang adadibagi menjadi tiga kelompok, yaitu:

M1 : terdiri dari mencit bunting normal (tanpa perlakuan)

- M2 : terdiri dari mencit bunting model preeklampsia tanpa perlakuan
- M3 : terdiri dari mencit bunting model preeklampsia dengan perlakuan mendapat VEGF 121 rekombinan.

Tahapan selanjutnya adalah sel endotel diisolasi dari plasenta normotensif dan preeklampsia pada hari yang sama yaitu hari ke 16 gestasi. Kemudian, chorionic plasenta dipotong dan dicacah secara menyeluruh, dicuci dalam larutan garam seimbang Hank (HBSS) dan melalui saringan 90 μm . Tipe I kolagenase (Sigma, USA) ditambahkan pada 1,4 mL/g jaringan plasenta, dan konten itu diguncang pada suhu 37 °C selama 80 menit. Setelah beberapa kali dicuci dengan HBSS dan centrifugasi 100xg selama 5 menit, pellet ditempatkan di atas es. Setelah resus pending dan inkubasi sel pellet dalam 0,5 ml tripsin-EDTA/g jaringan, suspensi disaring melalui saringan 250 μm . Filtrat disentrifugasi pada 100xG selama 5 menit. Suspensi sel tunggal yang diperoleh diperlakukan dengan Dynabead CD31 (Invitrogen, Kanada) dan dicuci dengan phosphate-buffered saline (PBS) dengan 0,1% albumin serum sapi.

Campuran diinkubasi pada suhu 4 °C selama 20 menit dengan kemiringan dan putaran. Kompleks sel endotel Dynabead dikumpulkan menggunakan konsentrat ormagnetik (Invitrogen, Kanada). Sel-sel dicuci dua kali dengan PBS dan dikultur pada 1 juta sel per culture flask (125 mm) pada medium M199 yang mengandung 10% serum betis janin dan antibiotic dan larutan antimycotic (HIMEDIA, Mumbai, India) dalam atmosfer CO₂ 5% pada suhu 37 °C sampai memperoleh confluency.

Kelangsungan hidup sel dinilai dengan uji pengecualian pewarna tripan blue. Sel dengan kelangsungan hidup kurang dari 75% dikeluarkan dari penelitian.

Bentuk diinduksi dari HSP70 dalam trofoblas itu secara dihitung kuantitatif dengan menggunakan HSP70 (EKS-700B, Stressgen, Kanada) ELISA kit sesuai dengan instruksi dari pabriknya.

Tabel 3.1 Skala semikuantitatif IRS merupakan hasil perkalian antara skor persentase sel positif (A) dengan Skor Intensitas reaksi warna (B), jadi $IRS = (A \times B)$

A	B
Skor 0 : tidak ada sel positif	Skor 0 : tidak ada reaksi warna
Skor 1 : Sel positif kurang dari 10%	Skor 1 : Intensitas warna lemah
Skor 2 : Sel positif antara dari 11% - 50%	Skor 2 : Intensitas warna sedang
Skor 3 : Sel positif antara dari 51% - 80%	Skor 3 : Intensitas warna kuat
Skor 4 : Sel positif antara dari lebih dari 80%	

3.10 Pengolahan Data

Penelitian ini menggunakan skala pengukuran semikuantitatif. Data dilakukan uji non parametrik menggunakan Kruskal-Wallis. Apabila didapatkan perbedaan signifikan, untuk melihat perbedaan satu kelompok dibandingkan dengan kelompok lain dilanjutkan dengan uji statistic Mann Whitney. Perhitungan statistic pada penelitian ini menggunakan tingkat

kemaknaan 0,05 (*confidentinterval* 95%) sehingga bila dalam uji statsitika didapatkan $p < 0,05$ dapat diartikan bermakna, sedangkan $p > 0,05$ diartikan tidak bermakna.

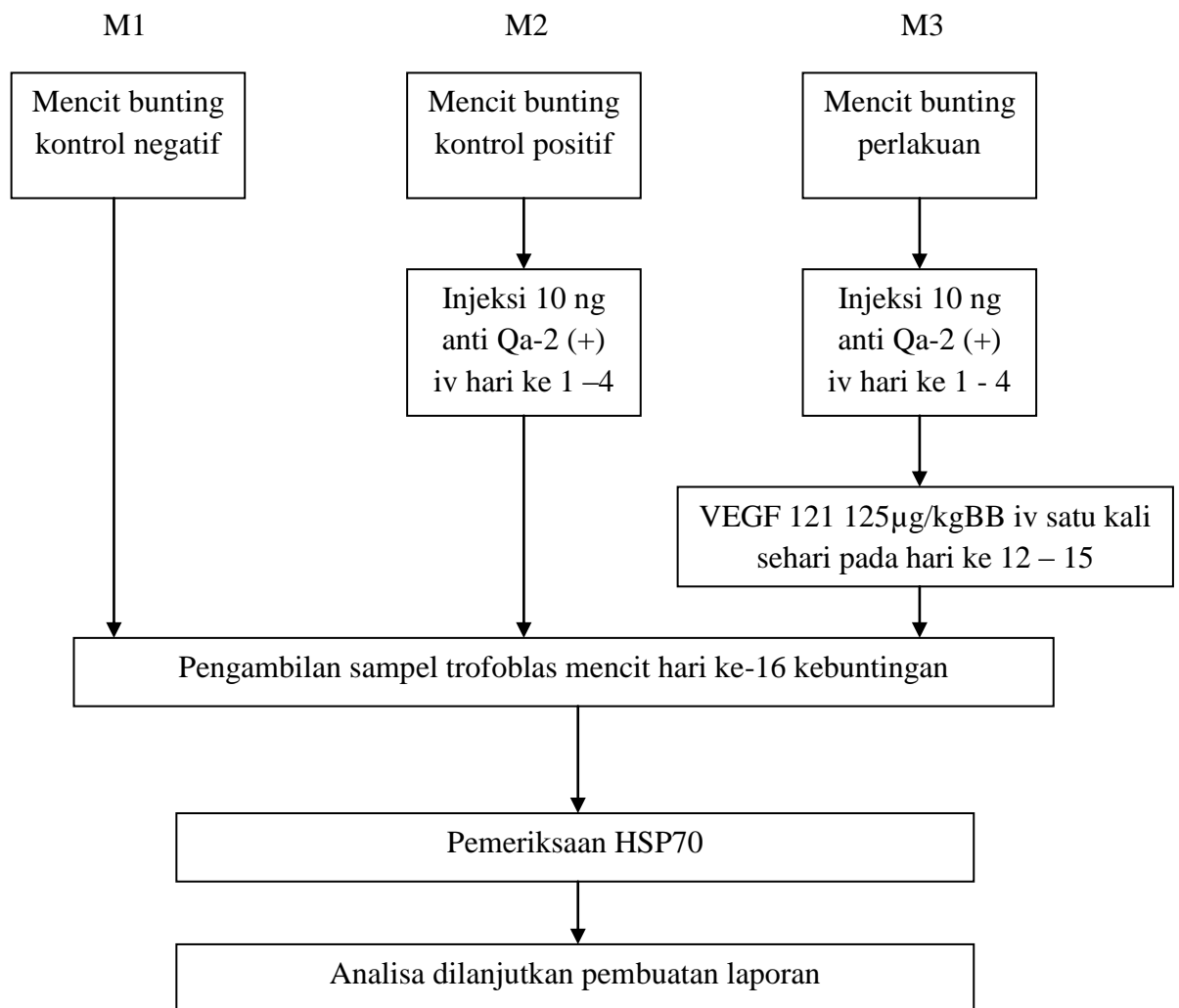
3.11 Anggaran

Anggaran pada penelitian ini bersifat mandiri.

3.12 Kelayakan Etik

Kelayakan etik didapat dari Komisi Etik Penelitian Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya.

3.13 Alur Penelitian



BAB IV

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

4.1 Deskripsi Data Penelitian

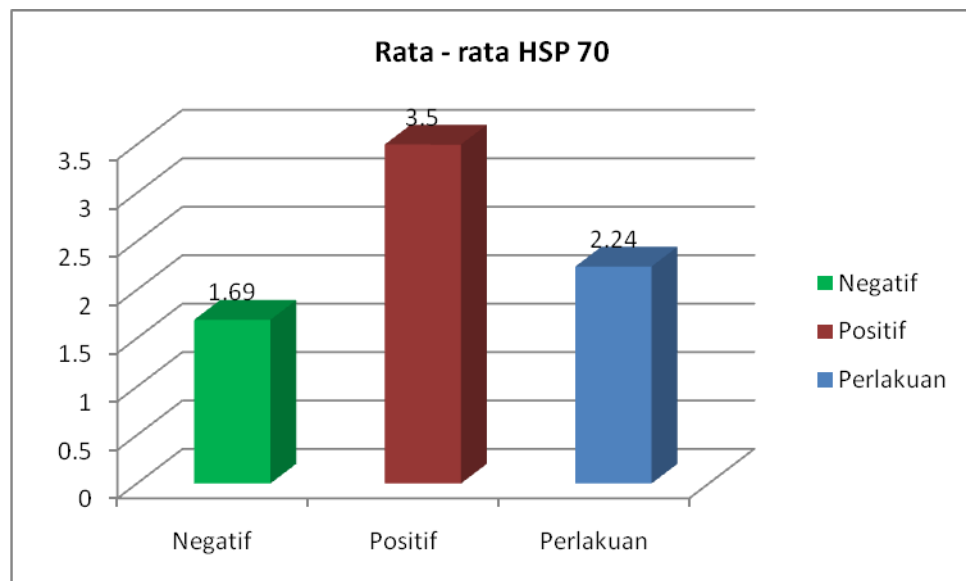
Sampel penelitian menggunakan hewan mencit (*Mus musculus* galur Swiss) betina bunting, umur 3 bulan, sehat, dengan berat badan 20-25 gram. Pengambilan sampel preparat dilakukan pada serum mencit yang selanjutnya disentrifugasi dalam suhu ruang dengan gaya 3000 gram per 10 menit kemudian disimpan dalam suhu 80°C sebelum dilakukan pengukuran.

Jumlah tikus 30 yang dibagi kedalam 3 kelompok yaitu kelompok kontrol (-) yaitu mencit bunting normal (tanpa perlakuan), kelompok kontrol (+) yaitu mencit bunting model preeklamsia tanpa perlakuan dan Kelompok Perlakuan yaitu kelompok mencit bunting model preeklamsia dengan perlakuan mendapat VEGF 121 rekombinan.

Tabel 4.1. Deskripsi Nilai HSP 70

Variabel	N	Min	Max	Rerata	SD
Normal	10	0.90	3.20	1.6900	0.68710
Preeklamsia	10	2.40	5.10	3.5000	0.95568
Perlakuan	10	0.90	3.50	2.2400	0.84879

Dari data diatas didapatkan bahwa rerata ekspresi HSP 70 pada kelompok normal adalah 1.69 ± 0.68 per μm^2 , rerata ekspresi HSP 70 pada kelompok preeklamsia tanpa perlakuan adalah 3.50 ± 0.95 per μm^2 , dan rerata ekspresi HSP-70 pada kelompok preeklamsia dengan perlakuan adalah 2.24 ± 0.84 per μm^2 .



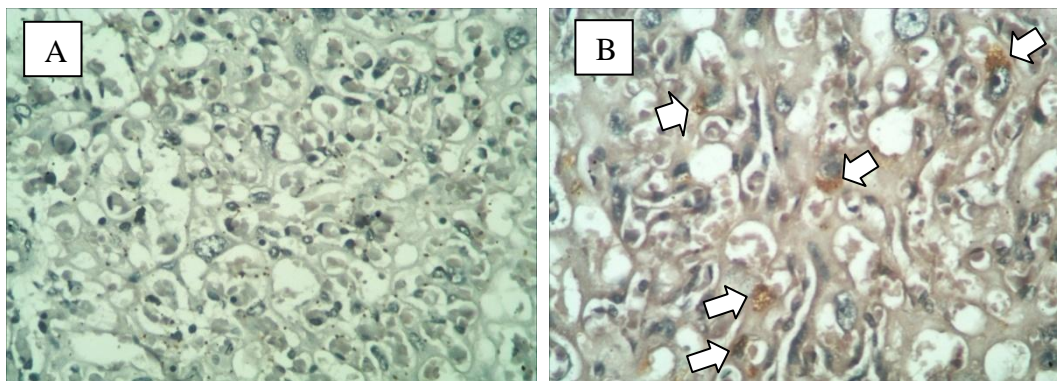
Gambar 4.1. Grafik Nilai Rata-rata HSP 70

Gambar 4.1 menunjukkan bahwa rerata ekspresi HSP-70 pada kelompok negatif (kelompok normal) adalah rendah ($1.69/\mu\text{m}^2$), meningkat pada kelompok preeklamsia tanpa perlakuan ($3.50/\mu\text{m}^2$) dan turun pada kelompok preeklamsia dengan perlakuan VEGF 121 rekombinan ($2.24/\mu\text{m}^2$)

Analisis statistik dengan menggunakan uji normalitas *Kruskal-Wallis test* terhadap variabel penelitian kelompok kontrol (-), kelompok kontrol (+) dan kelompok perlakuan didapatkan $p=0.001$ ($p<0.05$) yang berarti data tidak terdistribusi secara normal, sehingga untuk selanjutnya uji yang dipakai untuk mencari perbedaan rerata pada ketiga kelompok penelitian tersebut menggunakan *uji Mann-Whitney Test*.

4.2 Ekspresi HSP 70 pada Kelompok Preeklamsia dan Kelompok Normal

Penentuan ekspresi HSP-70 pada jaringan trofoblas plasenta dilakukan dengan pengecatan dengan teknik immunohistokimia *staining* dengan menggunakan antibody monoklonal anti human HSP-70 kemudian diamati ekspresinya secara mikroskopik pada 9 lapang pandang. Tampak pada gambar 4.2 bahwa ekspresi HSP-70 pada trofoblas kehamilan dengan preeklamsia (kontrol +) dengan perbesaran 400x, menggunakan mikroskop Olympus seri cx21. Ekspresi HSP-70 ditunjukkan gambaran warna coklat chromogen (tanda panah) (Gambar B). Pada kehamilan normal (kelompok kontrol -) menunjukkan tidak adanya ekspresi HSP-70 (Gambar A)



Gambar 4.2. Ekspresi HSP-70 dengan metode imunohistokimia pada kehamilan normal dan kehamilan preeklamsia.

Dengan menggunakan metode penghitungan sebaran HSP-70 (berwarna coklat chromogen) sel trofoblas pada jaringan trofoblas, maka didapatkan hasil rerata sebaran sel trofoblas per μm^2 jaringan trofoblas seperti tertera pada tabel

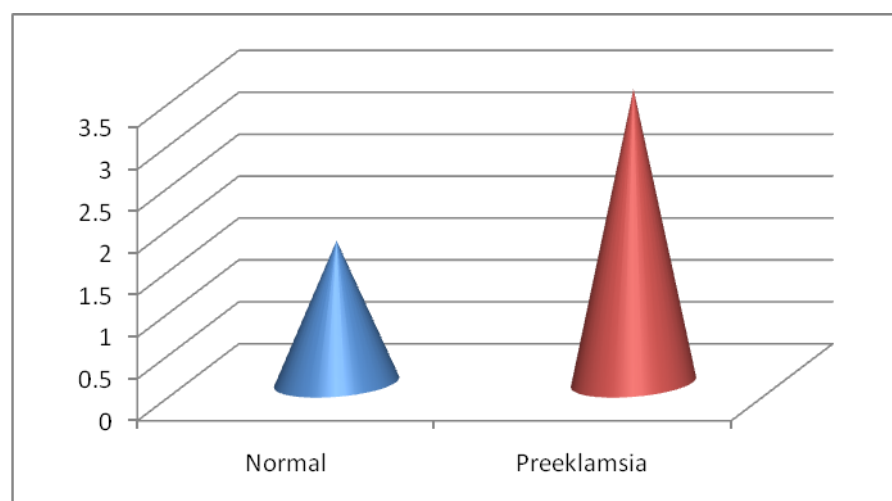
4.2. Distribusi HSP-70 tampak lebih banyak pada plasenta preeklamsia ($3.50 \pm 0.95 / \mu\text{m}^2$), dibandingkan dengan plasenta normal ($1.69 \pm 0.68 / \mu\text{m}^2$).

Tabel 4.2. Distribusi Rerata ekspresi HSP-70 pada Jaringan Trofoblas Kelompok Preeklamsia dan Kelompok Normal

Variabel	Kelompok	N	Distribusi Rerata ($/\mu\text{m}^2$)
HSP-70	Normal	10	1.69 ± 0.68
	Preeklamsia	10	3.50 ± 0.95

Tabulasi hasil perhitungan distribusi rerata HSP-70 per μm^2 jaringan trofoblas, nampak distribusi rerata HSP-70 dalam jaringan trofoblas pada kelompok preeklamsia lebih tinggi dari pada kelompok hamil normal.

Hasil interpretasi grafik tampak jelas bahwa HSP-70 pada kelompok preeklamsia mempunyai puncak lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok normal. (Gambar 4.2)



Gambar 4.3. Distribusi Rerata HSP-70 Pada Kelompok Normal Dan Kelompok Preeklamsia

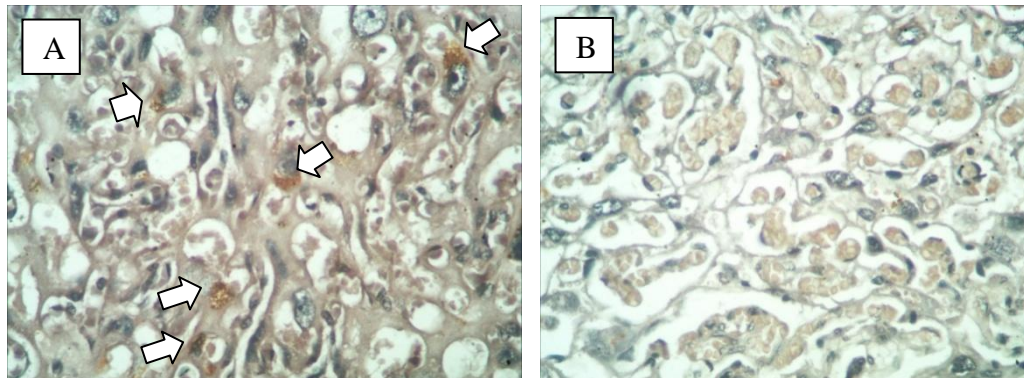
Tabel 4.3 Uji Beda Rerata (Uji Bivariate) HSP-70 pada Jaringan Trofoblas Kelompok Preeklamsia dan Kelompok Normal

Variabel	Kelompok	N	Mean	SD	Nilai p
HSP-70	Preeklamsia	10	3.50	0.95	0.00
	Normal	10	1.69	0.68	

Analisis uji *Mann-Whitney test* dengan menggunakan tingkat kepercayaan 95%, $\alpha=0,05$, membuktikan bahwa ekspresi HSP-70 antara kelompok normal dan kelompok preeklamsia terdapat perbedaan yang signifikan dimana terdapat nilai $p=0.00$ (<0.05).

4.3 Ekspresi HSP 70 pada Kelompok Preeklamsia Tanpa Perlakuan dan Kelompok Perlakuan VEGF 121 Rekombinan

Penentuan ekspresi HSP-70 pada jaringan trofoblas plasenta dilakukan dengan pengecatan dengan teknik immunohistokimia *staining* dengan menggunakan antibody monoklonal anti human HSP-70 kemudian diamati ekspresinya secara mikroskopik pada 9 lapang pandang. Tampak pada gambar 4.4 bahwa ekspresi HSP-70 pada trofoblas kehamilan dengan preeklamsia tanpa perlakuan dengan perbesaran 400x, menggunakan mikroskop Olympus seri cx21. Ekspresi HSP-70 ditunjukkan gambaran warna coklat chromogen (tanda panah) (Gambar A). Pada kelompok preeklamsia dengan perlakuan VEGF 121 rekombinan (kelompok perlakuan) menunjukkan tidak adanya ekspresi HSP-70 (Gambar B)



Gambar 4.4. Ekspresi HSP-70 dengan metode imunohistokimia pada kehamilan preeklamsia tanpa perlakuan dan kehamilan preeklamsia dengan perlakuan VEGF 121 rekombinan.

Dengan menggunakan metode penghitungan sebaran HSP-70 (berwarna coklat chromogen) sel trofoblas pada jaringan trofoblas, maka didapatkan hasil rerata sebaran sel trofoblas per μm^2 jaringan trofoblas seperti tertera pada tabel 4.4. Distribusi HSP-70 tampak lebih sedikit pada plasenta preeklamsia dengan perlakuan VEGF 121 rekombinan ($2.24 \pm 0.84 / \mu\text{m}^2$), dibandingkan dengan plasenta preeklamsia tanpa perlakuan ($3.50 \pm 0.95 / \mu\text{m}^2$).

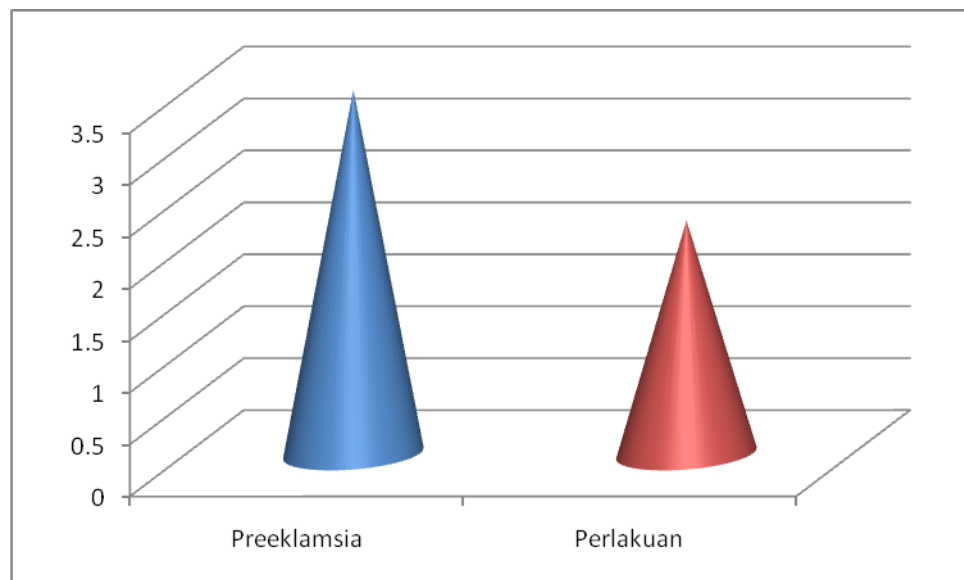
Tabel 4.4. Distribusi Rerata ekspresi HSP-70 pada Jaringan Trofoblas Kelompok Preeklamsia Tanpa Perlakuan dan Kelompok Preeklamsia dengan Perlakuan VEGF 121 Rekombinan

Variabel	Kelompok	N	Distribusi Rerata ($/\mu\text{m}^2$)
HSP-70	Preeklamsia	10	3.50 ± 0.95
	Perlakuan	10	2.24 ± 0.84

Tabulasi hasil perhitungan distribusi rerata HSP-70 per μm^2 jaringan trofoblas, nampak penurunan distribusi rerata HSP-70 dalam jaringan trofoblas

dari kelompok preeklamsia dengan perlakuan VEGF 121 rekombinan ke kelompok preeklamsia tanpa perlakuan.

Hasil interpretasi grafik tampak jelas bahwa HSP-70 pada kelompok preeklamsia dengan perlakuan VEGF 121 rekombinan mempunyai puncak lebih rendah dibandingkan dengan kelompok preeklamsia tanpa perlakuan. (Gambar 4.5)



Gambar 4.5. Distribusi Rerata HSP-70 Pada Kelompok Preeklamsia Tanpa Perlakuan Dan Kelompok Preeklamsia Dengan Perlakuan VEGF 121 Rekombinan

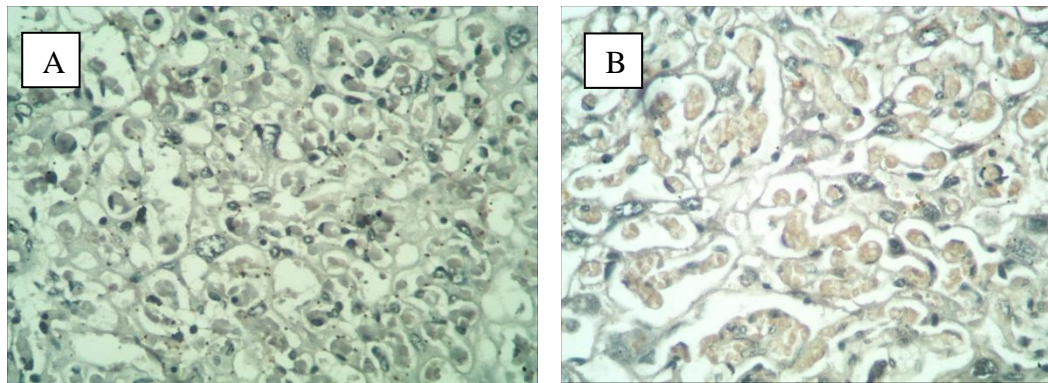
Tabel 4.5 Uji Beda Rerata (Uji Bivariate) HSP-70 pada Jaringan Trofoblas Kelompok Preeklamsia Dengan Perlakuan VEGF 121 Rekombinan dan Kelompok Preeklamsia Tanpa Perlakuan

Variabel	Kelompok	N	Mean	SD	Nilai p
HSP-70	Perlakuan	10	2.24	0.84	0.00
	Preeklamsia	10	3.50	0.95	

Analisis uji *Mann-Whitney test* dengan menggunakan tingkat kepercayaan 95%, $\alpha=0,05$, membuktikan bahwa ekspresi HSP-70 antara kelompok preeklamsia tanpa perlakuan dan kelompok preeklamsia dengan perlakuan VEGF 121 rekombinan terdapat perbedaan yang signifikan dimana terdapat nilai $p=0.00$ (<0.05).

4.4 Ekspresi HSP 70 pada Kelompok Preeklamsia Dengan Perlakuan VEGF 121 Rekombinan dan Kelompok Normal

Penentuan ekspresi HSP-70 pada jaringan trofoblas plasenta dilakukan dengan pengecatan dengan teknik immunohistokimia *staining* dengan menggunakan antibody monoklonal anti human HSP-70 kemudian diamati ekspresinya secara mikroskopik pada 9 lapang pandang. Tampak pada gambar 4.6 bahwa ekspresi HSP-70 pada trofoblas kehamilan preeklamsia dengan perlakuan VEGF 121 rekombinan maupun pada kelompok kehamilan normal dengan perbesaran 400x, menunjukkan tidak adanya ekspresi HSP-70 (Gambar A adalah kelompok hamil normal dan Gambar B adalah ekspresi pada kelompok preeklamsia dengan perlakuan VEGF 121 rekombinan)



Gambar 4.6. Ekspresi HSP-70 dengan metode imunohistokimia pada kehamilan normal dan kehamilan preeklamsia dengan perlakuan VEGF 121 rekombinan

Dengan menggunakan metode penghitungan sebaran HSP-70 sel trofoblas pada jaringan trofoblas, maka didapatkan hasil rerata sebaran sel trofoblas per μm^2 jaringan trofoblas seperti tertera pada tabel 4.6. Distribusi HSP-70 tampak lebih banyak pada plasenta preeklamsia dengan perlakuan VEGF 121 rekombinan ($2.24 \pm 0.84 / \mu\text{m}^2$), dibandingkan dengan plasenta normal ($1.69 \pm 0.68 / \mu\text{m}^2$).

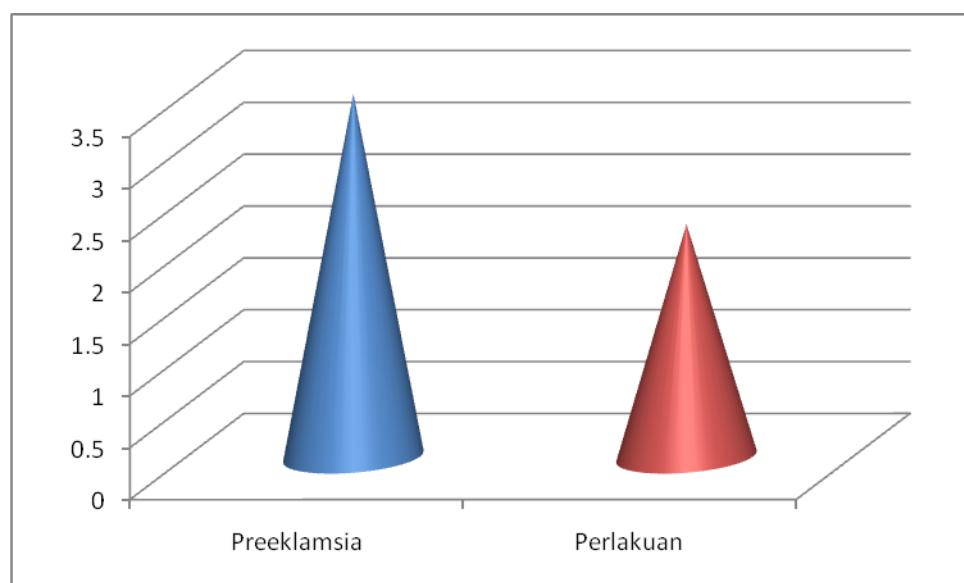
Tabel 4.6. Distribusi Rerata ekspresi HSP-70 pada Jaringan Trofoblas Kelompok Preeklamsia Dengan Perlakuan VEGF 121 Rekombinan dan Kelompok Normal

Variabel	Kelompok	N	Distribusi Rerata ($/\mu\text{m}^2$)
HSP-70	Normal	10	1.69 ± 0.68
	Perlakuan	10	2.24 ± 0.84

Tabulasi hasil perhitungan distribusi rerata HSP-70 per μm^2 jaringan trofoblas, nampak distribusi rerata HSP-70 dalam jaringan trofoblas pada

kelompok preeklamsia dengan perlakuan VEGF 121 rekombinan lebih tinggi dari pada kelompok hamil normal.

Hasil interpretasi grafik tampak jelas bahwa HSP-70 pada kelompok preeklamsia perlakuan VEGF 121 rekombinan mempunyai puncak lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok normal. (Gambar 4.7)



Gambar 4.7. Distribusi Rerata HSP-70 Pada Kelompok Normal Dan Kelompok Preeklamsia perlakuan VEGF 121 rekombinan

Tabel 4.7 Uji Beda Rerata (Uji Bivariate) HSP-70 pada Jaringan Trofoblas Kelompok Preeklamsia Dengan Perlakuan VEGF 121 Rekombinan dan Kelompok Normal

Variabel	Kelompok	N	Mean	SD	Nilai p
HSP-70	Perlakuan	10	2.24	0.84	0.00
	Normal	10	1.69	0.68	

Analisis uji *Mann-Whitney test* dengan menggunakan tingkat kepercayaan 95%, $\alpha=0,05$, membuktikan bahwa ekspresi HSP-70 antara kelompok normal dan kelompok preeklamsia dengan perlakuan VEGF 121 rekombinan tidak terdapat perbedaan yang signifikan dimana terdapat nilai $p=0.16$ (>0.05).

4.5 Pembahasan

Analisis statistik dengan menggunakan uji normalitas *Kruskal-Wallis test* terhadap variabel penelitian kelompok kontrol (-), kelompok kontrol (+) dan kelompok perlakuan didapatkan $p=0.001$ ($p<0.05$) yang berarti data tidak terdistribusi secara normal, sehingga untuk selanjutnya uji yang dipakai untuk mencari perbedaan rerata pada ketiga kelompok penelitian tersebut menggunakan uji *Mann-Whitney Test*. Dari hasil penelitian didapatkan bahwa rerata ekspresi HSP-70 untuk kelompok hamil normal didapatkan $1.69 \pm 0.68 / \mu\text{m}^2$, rerata ekspresi HSP-70 pada kelompok preeklamsia tanpa perlakuan didapatkan $3.50 \pm 0.95 / \mu\text{m}^2$ dan rerata ekspresi HSP-70 pada preeklamsia dengan perlakuan VEGF 121 rekombinan didapatkan $2.24 \pm 0.84 / \mu\text{m}^2$.

Hasil uji *Mann-Whitney test* dengan menggunakan tingkat kepercayaan 95%, $\alpha=0,05$, didapatkan bahwa rerata ekspresi HSP-70 pada kelompok hamil normal dibandingkan dengan kelompok preeklamsia tanpa perlakuan terjadi peningkatan yaitu $1.69 \pm 0.68 / \mu\text{m}^2$ untuk ekspresi HSP-70 pada kehamilan normal dan $3.50 \pm 0.95 / \mu\text{m}^2$ pada kehamilan preeklamsia tanpa perlakuan. Dan secara statistik terdapat perbedaan yang signifikan

dimana terdapat nilai $p=0.00$ (<0.05). Hal ini berarti bahwa terjadi peningkatan ekspresi HSP-70 pada kehamilan preeklamsia.

Hasil uji *Mann-Whitney test* untuk perbedaan rerata ekspresi HSP-70 pada kelompok kehamilan preeklamsia tanpa perlakuan dibandingkan dengan kelompok preeklamsia dengan perlakuan VEGF 121 rekombinan didapatkan adanya penurunan rerata ekspresi HSP-70 yaitu $3.50 \pm 0.95 / \mu\text{m}^2$ pada kehamilan preeklamsia tanpa perlakuan dan $2.24 \pm 0.84 / \mu\text{m}^2$ pada kelompok preeklamsia dengan perlakuan VEGF 121 rekombinan. Secara statistik didapatkan perbedaan yang signifikan dimana terdapat nilai $p=0.00$ (<0.05). Hal ini berarti bahwa terjadi penurunan ekspresi HSP-70 pada kehamilan preeklamsia dengan perlakuan VEGF 121 rekombinan.

Hasil uji *Mann-Whitney test* perbandingan rerata HSP-70 kelompok kehamilan normal dibandingkan dengan kelompok preeklamsia dengan perlakuan VEGF 121 rekombinan didapatkan adanya peningkatan rerata ekspresi HSP-70 yaitu $1.69 \pm 0.68 / \mu\text{m}^2$ untuk ekspresi HSP-70 pada kehamilan normal dan $2.24 \pm 0.84 / \mu\text{m}^2$ pada kelompok preeklamsia dengan perlakuan VEGF 121 rekombinan. Namun secara statistik peningkatan tersebut tidak terdapat perbedaan yang signifikan dimana terdapat nilai $p=0.16$ (>0.05).

Menurut Padmini dan Lavanya (2011) HSP70 adalah protein terinduksi stress yang memainkan peran penting pada mekanisme pertahanan terhadap agen yang memacu cedera oksidatif, mencegah agregasi protein yang terinduksi stress dan memperbaiki keadaan ikatan protein normal.

HSP70 adalah family multigen yang memiliki berat molekul antara 10 sampai 150 kDa dan ditemukan pada semua kompartemen sel dan terdapat bukti bahwa HSP diproduksi oleh jaringan plasenta dan memiliki peran fisiologis dalam manajemen stress selama Preeklamsia (Padmini, 2011).

Sukhatme *et al* (2012) menjelaskan bahwa kadar HSP70 pada mamalia dapat diturunkan dengan agonis HspA12B suatu senyawa *growth faktor* seperti VEGF, bFGF, Ang-1 dan Ang-2. Mekanisme kerjanya adalah mengganggu HspA12B (turunan dari keluarga HSP70) berikatan dengan reseptornyasehingga kerusakan sel dapat dicegah pada sel-sel endotel yang masih sehat dan mencegah semakin banyaknya sel yang mengalami apoptosis. Sehingga kadar HSP70 yang timbul sebagai mekanisme pertahanan pada sel endotel yang rusak tidak meningkat secara signifikan. Hasil akhirnya adalah terjadinya vasodilatasi dan tidak terjadinya manifestasi berupa hipertensi, proteinuria dan lain-lain. Sementara, Liu *et al* (2013) menjelaskan efek *growth faktor* lain pada vili korialis mamalia. Disebutkan bahwa *Insulin-like Growth Faktor 1* (IGF 1) dapat melindungi perkembangan normal dari pra-implantasi embrio sapi dengan menghambat apoptosis selama periode stres panas. Sehingga pengeluaran protein *heat shock* tersebut berkurang.

Maynard *et al* (2011) dalam penelitiannya menyebutkan bahwa pemberian terapi VEGF 121 rekombinan dapat menetralkan efek dari peningkatan sFlt-1 pada preeklampsia sehingga pengikatan sFlt-1 ke faktor proangiogenik dapat menurunkan fungsi angiogenesis kembali normal. Pendapat

ini sejalan dengan Shah (2007) yang mengatakan bahwa VEGF 121 rekombinan, yang merupakan protein proangiogenik berperan terhadap proses vaskulogenensis dan angiogenesis dan mempunyai reseptor di dinding endotel yaitu VEGFR-1. Dimana VEGFR-1 bisa terikat lebih kuat terhadap sFlt-1. Pengobatan dengan pemberian VEGF 121 rekombinan memiliki kemampuan menghambat sirkulasi sFlt-1 dalam darah, menurunkan tekanan darah maternal, perbaikan fungsi endotel dan mengurangi hipoksia plasenta.

VEGF memiliki beberapa reseptor yaitu VEGFR-1 atau dikenal juga dengan Flt-1, VEGFR-2, Tie-1, dan Tie-2. Reseptor-reseptor ini juga memiliki peran penting dalam perkembangan vaskular plasenta. Perubahan regulasi dan *signaling* pada jalur angiogenik awal gestasi juga membantu terjadinya invasi sitotrofoblas yang tidak adekuat seperti yang terlihat pada Preeklampsia. Pada manusia, ligand dan reseptor VEGF diekspresikan dalam kadar tinggi oleh jaringan plasenta pada trimester pertama. Pada preeklampsia, terjadi perubahan pada invasi sitotrofoblas terkait VEGF, PlGF, dan Flt-1 (Young *et al*, 2010).

Secara alamiah, pada keadaan preeklampsia, keadaan hipoksia yang terjadi akan menghasilkan H_2O_2 yang akan memberikan sinyal untuk terjadinya pengeluaran hCG. hCG ini akan berperan membantu pengeluaran VEGF (Ekambaran, 2011). Namun kadar VEGF ini belum adekuat untuk melawan keadaan preeklampsia tersebut.

Senada dengan hal tersebut, Warington *et al* (2013) memaparkan pada kondisi plasenta yang iskemik pada menciit adalah sebagai suatu akibat

dari adanya penurunan tekanan perfusi uterus, maka akan terjadi peningkatan sFlt-1 dan penurunan secara drastis kadar VEGF bebas pada sirkulasi. Seperti yang dilaporkan juga bahwa pemberian infus VEGF121 pada plasenta mencit yang iskemik akan mengembalikan tingkat GFR dan fungsi endotel, sehingga tingkat iskemik pada plasenta dan juga tekanan darah akan menurun.

Sehingga terapi dari VEGF 121 rekombinan adalah untuk meningkatkan kadar VEGF tersebut. VEGF 121 rekombinan adalah VEGF eksternal yang merupakan protein bersifat proangiogenik yang berperan terhadap proses vaskulogenesis dan angiogenesis, mempunyai reseptor di dinding endotel yaitu VEGFR-1 dan bisa terikat juga dengan ikatan yang lebih kuat pada sFlt-1. VEGF 121 rekombinan salah satu bentuk VEGF yang merupakan *diffusible acid polypeptide* mempunyai aktivitas seperti VEGF. VEGF 121 rekombinan berikatan dengan VEGFR-1 sehingga memicu proses angiogenesis (Maynard *et al*, 2011).

Keterbatasan penelitian

1. Penelitian ini terbatas pada jumlah sampel yang sedikit.
2. Pada penelitian ini tekanan darah sample maupun protein urin tidak dapat dilakukan.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Pemberian VEGF 121 rekombinan berpengaruh signifikan pada penurunan ekspresi HSP-70 pada mencit (*Mus musculus*) model preeklampsia.

5.2 Saran

Perlu penelitian lebih lanjut untuk mengetahui efek pemberian VEGF rekombinan dengan menambah perlakuan penggunaan dosis yang berbeda, sehingga hasil penelitian dapat digunakan sebagai perbandingan.